

EFEITO DA ALTITUDE NA DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE *Lychnophora pinaster* Mart.

ROBERTO DE OLIVEIRA PORTELLA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas (Botânica).
Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
Vegetal

BOTUCATU-SP

-2021-

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DA ALTITUDE NA DIVERSIDADE QUÍMICA E
GENÉTICA DE *Lychnophora pinaster* Mart.

ROBERTO DE OLIVEIRA PORTELLA

PROFA. DRA. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

(Orientador)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica). Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal

BOTUCATU-SP

-2021-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Portella, Roberto de Oliveira.

Efeito da altitude na diversidade química e genética de
Lychnophora pinaster Mart / Roberto de Oliveira Portella.
- Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques

Capes: 20303009

1. Biologia computacional. 2. Genética de populações.
3. Cerrados. 4. Óleos essenciais. 5. Sesquiterpenos.

Palavras-chave: Bioinformática; Cerrado; Genética de
populações; Óleos essenciais; Sesquiterpenos.

“Minha querida, você ri e não eu, se sabe quão bizarro é assunto que me traz aqui. Aprendi não depreciar a crença dos outros, por mais peculiar que pode ser. Tento manter a cabeça aberta, porque não são coisas corriqueiras da vida que podem fechar, mas coisas insólitas, extraordinários, que fazem duvidar da própria sanidade.”

Drácula, Bram Stoker, 1897.

Dedico à minha família e aos meus amigos

Agradecimentos

Dedico ao Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos 2017/24927-7 e 2020/01064-6) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento fornecido para desenvolvimento desta tese e de demais projetos;

Dedico a todas as pessoas do Instituto Agrônomo (IAC), do Departamento de Genética da Universidade de Campinas (Unicamp), do Colégio de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (Esalq/USP), da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), do Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e da Universidade de Taubaté (UNITAU); pois sem a ajuda e o comprometimento dessas pessoas, a confecção de minha tese não seria uma realidade;

Dedico a minha família e aos meus amigos pelo suporte, apoio, conversas agradáveis, conselhos e avisos desde meu início de carreira até hoje;

Dedico a minha esposa Karin, pelo compenheirismo nesses últimos doze anos, pela confiança que você sempre teve em mim, pelo apoio nos momentos mais difíceis da minha vida e por acreditar que eu poderia chegar ao fim dessa jornada; e

Dedico a minha orientadora, a Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques pela confiança depositada em mim, por mostrar que eu seria capaz conduzir meus projetos a seu lado e por me guiar e acreditar em mim nesses últimos dez anos de parceria.

Sumário

Resumo	13
Abstract	14
I - Introdução	15
II - Objetivos	26
III - Material e Métodos	27
IV - Resultados	40
V - Discussão	69
VI - Conclusão	74
VII - Considerações Finais	75
VIII - Referencial Bibliográfico	76
IX - Anexos	88

Lista de Tabelas

Tabela 1. Populações de <i>Lychnophora pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil.	27
Tabela 2. Composição química média (%) dos óleos essenciais de populações de <i>L. pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil.	43
Tabela 3. Média dos valores dos fatores climáticos das populações de <i>L. pinaster</i> localizadas nas regiões Norte e metropolitana de Belo Horizonte (MrBH), Minas Gerais, Brasil.	46
Tabela 4. Valores de correlação de cada componente principal.....	46
Tabela 5. Diversidade genética das populações de <i>L. pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil.	56
Tabela 6. Matriz de distâncias geográficas (km) entre as populações de <i>Lychnophora pinaster</i> Minas Gerais, Brasil.	67
Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H (300 MHz), ^{13}C e DEPT (75 MHz) em CDCl_3 do sesquiterpeno com índice de retenção de 1506 isolado das folhas de <i>Lychnophora pinaster</i> , população da Serra da Moeda, MG, Brasil).	88
Tabela 8. Dados espectrais de RMN 2D (HSQC e HMBC) do sesquiterpeno com índice de retenção de 1504 isolado das folhas de <i>Lychnophora pinaster</i> , população da Serra da Moeda, MG, Brasil.	89

Lista de Figuras

- Figura 1.** Localização geográfica das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. no estado de Minas Gerais, Brasil.28
- Figura 2.** Fluxograma dos métodos desenvolvidos.29
- Figura 3.** Rendimento de produção dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. Os valores do rendimento de extração foram submetidos a análise *Kruskal-Wallis* ($p=1,6.10^{-11}$). As letras minúsculas representam as múltiplas comparações expressas pelo teste de Dunn ($p>0,05$) com correção de Bonferroni. Os pontos em cada boxplot indicam o número e distribuição dos indivíduos de cada população. Diamantina (DI, $0,05 \pm 0,02$, $n=17$); Grão-Mogol (GM, $0,05 \pm 0,02$, $n=24$); Olhos D'Água (ODMa, $0,18 \pm 0,11$, $n=16$); Raposos (RPS, $0,22 \pm 0,04$, $n=14$); Serra da Moeda (SM, $0,11 \pm 0,05$, $n=19$); e Serra do Rola-Moça (SRM, $0,08 \pm 0,08$, $n=19$).40
- Figura 4.** Análise de correlação entre as altitudes (m) e o rendimento de produção dos óleos essenciais (%) de cada indivíduo das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. Correlação de *Kendall* ($R=-0,02640$ e $p=-0.6866$).41
- Figura 5.** Análise de componentes principais da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* frente os fatores climáticos. a.tuj.m.: α -tujeno; a.pin.m.: α -pineno; X4Z.Hepten.ac.: 4Z-Hepten-1-ol; etilmetilpent.fp.: etil-3-metil pentanoato; sab.m.: sabineno; b.pin.m.: β -pineno; oxlinalool.mo.: óxido de dehidróxi-*trans*-linalol; o.cim.m.: *o*-cimeno; lim.m.: limoneno; X1.8.cin.mo.: 1,8-cineol; terp.m.: terpineno; terpinol.m.: terpinoleno; linalo.mo.: linalol; n.non.al.: *n*-nonanal; trans.pino.mo.: *trans*-pinocarveol; iso.3.tuj.mo.: *iso*-3-tujanol; pinocarv.co.: pinocarvona; terpinen.4.mo.: terpinen-4-ol; a.terpin.mo.: α -terpineol; mirt.mo.: mirtenol; mirtal.al.: mirtenal; n.dec.al.: *n*-decanal; trans.acpinoc.fp.: acetado de *trans*-pinocarvila; undec.al.: undecanal; cis.acpin.fp.: acetato de *cis*-pinocarvila; acger.m.: acetato de geranil; b.elem.s.: β -elemeno; a.cip.s.: α -cipereno; cis.car.s.: *cis*-cariofileno; trans.car.s.: *trans*-cariofileno; b.farn.s.: β -farneseno; a.hum.s.: α -humuleno; cumac.s.: cumacreno; tridec.al.: tridecanal; X4.oxo.15.nor.so.: 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno; Z.ner.so.: *Z*-nerolidol; sesqui03: sesquiterpeno 1; a.copaen.ol.so.: α -copaen-11-ol; decane.ac.: 1,10-decanediol; epi.long.so.: epi-longipinanol; spat.so.: espatulenol; carox..so.: óxido de cariofileno; b.copaen.ol.so.: β -copaen-4 α -ol; vir.so.: viridiflorol; trans.carp.fp.: *trans*-carpacina; sesqui04: sesquiterpeno 2; sesqui06: sesquiterpeno 3; allo.cedren.so.: *allo*-epóxido de aromadendreno; selina.ol.cedr.so.: cedr-8(15)-en-9- α -ol; X14.trans.car.so.: 14-hidróxi-(*Z*)-cariofileno; X14.epi.car.so.: 14-hidroxi-9-*epi*-(*E*)-cariofileno; germ.so.: germacrona; eudesm.ol.so.: eudesm-7(11)-en-4-ol; acetridec.ac.: acetato de (2*E*)-tridecenol; X14.a.hum.so.: 14-hidróxi- α -humuleno; X14.hid.dihidro.cari.so.: 14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno; benzibenz..fp.: benzoato de benzila; curcumen.so.: γ -curcumen-15-al; sesqui7: sesquiterpeno 4; acetoxi.hum..so.: 14-acetóxi- α -humuleno; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária; yield: rendimento dos óleos essenciais..49
- Figura 6.** Análise hierárquica de Cluster (AHC) das populações de *L. pinaster*. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; RPS: Raposos; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça. A AHC foi realizada com Distância Euclideana e enlace de Ward.52

Figura 7. Análise de heatmap da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* frente aos fatores climáticos. a.tuj.m.: α -tujeno; a.pin.m.: α -pineno; X4Z.Hepten.ac.: 4Z-Hepten-1-ol; etilmetilpent.fp.: etil-3-metil pentanoato; sab.m.: sabineno; b.pin.m.: β -pineno; oxlinalool.mo.: óxido de dehidróxi-*trans*-linalol; o.cim.m.: *o*-cimeno; lim.m.: limoneno; X1.8.cin.mo.: 1,8-cineol; terp.m.: terpineno; terpinol.m.: terpinoleno; linalo.mo.: linalol; n.non.al.: *n*-nonanal; trans.pino.mo.: *trans*-pinocarveol; iso.3.tuj.mo.: *iso*-3-tujanol; pinocarv.co.: pinocarvona; terpinen.4.mo.: terpinen-4-ol; a.terpin.mo.: α -terpineol; mirt.mo.: mirtenol; mirtal.al.: mirtenal; n.dec.al.: *n*-decanal; trans.acpinoc.fp.: acetado de *trans*-pinocarvila; undec.al.: undecanal; cis.acpin.fp.: acetato de *cis*-pinocarvila; acger.m.: acetato de geranyl; b.elem.s.: β -elemeno; a.cip.s.: α -cipereno; cis.car.s.: *cis*-cariofileno; trans.car.s.: *trans*-cariofileno; b.farn.s.: β -farneseno; a.hum.s.: α -humuleno; cumac.s.: cumacreno; tridec.al.: tridecanal; X4.oxo.15.nor.so.: 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno; Z.ner.so.: Z-nerolidol; sesqui03: sesquiterpeno 1; a.copaen.ol.so.: α -copaen-11-ol; decane.ac.: 1,10-decanediol; epi.long.so.: epi-longipinanol; spat.so.: espatulenol; carox..so.: óxido de cariofileno; b.copaen.ol..so.: β -copaen-4 α -ol; vir.so.: viridiflorol; trans.carp.fp.: *trans*-carpacina; sesqui04: sesquiterpeno 2; sesqui06: sesquiterpeno 3; allo.cedren.so.: *allo*-epóxido de aromadendreno; selina.ol.cedr.so.: cedr-8(15)-en-9- α -ol; X14.trans.car.so.: 14-hidróxi-(Z)-cariofileno; X14.epi.car.so.: 14-hidroxi-9-*epi*-(E)-cariofileno; germ.so.: germacrona; eudesm.ol.so.: eudesm-7(11)-en-4-ol; acetridec.ac.: acetato de (2E)-tridecenol; X14.a.hum.so.: 14-hidróxi- α -humuleno; X14.hid.dihidro.cari.so.: 14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno; benzibenz..fp.: benzoato de benzila; curcumen.so.: γ -curcumen-15-al; sesqui7: sesquiterpeno 4; acetoxi.hum..so.: 14-acetóxi- α -humuleno; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária; yield: rendimento dos óleos essenciais; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária. 53

Figura 8. Dendograma e heatmap da expressão da divergência populacional de *L. pinaster* baseada no índice de fixação (F_{ST}) de Wright. O índice de fixação foi baseado no set completo de marcadores SNP entre as populações de *L. pinaster*. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto. 57

Figura 9. Análise de erro por validação cruzada (*cross-validation*) que descreve o melhor valor de K para a estruturação das populações de *L. pinaster* estudadas. 58

Figura 10. Estrutura populacional de *L. pinaster* segundo a estimativa dos valores de K por validação cruzada. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto. 59

Figura 11. Distribuição dos loci com marcadores SNP segundo o modelo BayeScan expressos de acordo com os índices de fixação (F_{ST}). Os pontos cinzas indicam loci sob seleção neutra; os pontos azuis indicam os loci sob seleção balanceadora; e os pontos amarelos indicam loci sob seleção positiva. 60

Figura 12. Análise de erro por validação cruzada (*cross-validation*) que descreve o melhor valor de K para a clusterização das populações de *L. pinaster* estudadas para o set neutro de SNPs. 61

- Figura 13.** Análise da estrutura populacional de *L. pinaster* de acordo com o set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.61
- Figura 14.** Análise de componentes principais (ACP) baseada no set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.62
- Figura 15.** Análise da estrutura populacional de *L. pinaster* de acordo com o set positivo de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.63
- Figura 16.** Análise de componentes principais (ACP) baseada no set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.64
- Figura 17.** Análise de componentes principais (A) baseada na seleção de marcadores SNP segundo o modelo PCAdapt. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto. B: plot Manhattan; C: plot dos valores de Q-Q; D: plot dos valores de p ($p < 0,5 \times 10^{-3}$).66
- Figura 18.** Estrutura química do sesquiterpeno 4-oxo-15-nor-eudesmano-11-eno isolado no óleo essencial da população Serra da Moeda com índice de retenção linear de 1504 (IRL calc)89

Lista de Abreviaturas

CG: cromatógrafo a gás

EM: espectrômetro de massas

CG-EM: cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas

CG-DIC: cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas

IRL: Índice de retenção linear

ACP Análise de Componentes Principais

AHC: Análise Hierárquica de Cluster

NGS: Sequenciamento de próxima geração ou *Next-generation Sequencing*

GBS: *genotyping-by-sequencing*

SNP: Nucleotídeo de polimorfismo único

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

ODMa: população de Olhos D'Água

DI: População de Diamantina

GM: População de Grão-Mogol

SRM: População da Serra do Rola-Moça

SM: População de Serra da Moeda

RPS: População de Raposos

SA: População de Serra da Arnica

SB: População de Serra Branca

SSa: População de Serra do Salto

MrBH: Região metropolitana de Belo Horizonte

CV: Campos das Vertentes

π : diversidade nucleotídica

Ho: Heterozigosidade observada

He: Heterozigosidade esperada

A_p: Alelos privados

P: Frequência alélica dos alelos mais frequentes por locus

F_{IS}: Coeficiente de endogamia intrapopulacional

F_{ST}: coeficiente de fixação

Resumo

Lychnophora pinaster Mart. (Asteraceae) é considerada uma espécie endêmica do Cerrado, utilizada na medicina tradicional e distribuída no gradiente de altitude das serras do estado de Minas Gerais. Essas variações de altitude das serras podem modificar os fatores climáticos que moldam os padrões de isolamento geográfico entre as populações e atuam como fatores na seleção natural, interferindo na diversidade genética e na diversidade da composição química dos óleos essenciais de espécies endêmicas. Diante do trecho descrito anteriormente, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da altitude na diversidade genética e na composição química de óleos essenciais de populações de *L. pinaster* encontradas em diferentes altitudes. Indivíduos de *Lychnophora pinaster* de cinco populações de duas regiões do estado de Minas Gerais (Norte e Região metropolitana de Belo Horizonte) tiveram seus óleos essenciais analisados, e indivíduos de oito populações encontrados em três regiões (Norte; Região metropolitana de Belo Horizonte; e Campo das Vertentes) tiveram seus dados genômicos analisados por marcadores SNP. Os principais resultados indicaram que as populações de *L. pinaster* apresentam elevada diversidade genética e química. Os compostos majoritários nos óleos essenciais foram 14-hidróxi- α -humuleno (GM e DI), cedr-8(15)-en-9- α -ol (ODMa), 14-acetoxi- α -humuleno (SRM) e 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno (SM). Além disso, cada população apresenta uma composição química distinta de óleos essenciais, fortemente determinada por diferentes fatores climáticos. Altitudes elevadas (1366 m e 1498 m) encontradas na Região metropolitana de Belo Horizonte sofrem com os efeitos da precipitação e da amplitude térmica diurna, expressos na composição química dos óleos essenciais, e as populações encontradas em baixas altitudes (<900 m) são fortemente influenciadas por temperaturas máximas e mínimas e umidade relativa. Os dados genéticos indicam que as populações de *L. pinaster* apresentam segregação espacial alélica, determinada pelas serras de Minas Gerais, de forma que as faixas de altitude determinaram a diversidade genética de *L. pinaster*.

Palavras-chave: arnica, óleos essenciais, sesquiterpenos, genética de populações, Cerrado

Abstract

Lychnophora pinaster Mart. (Asteraceae) is considered a species endemic to the Cerrado, used in traditional medicine and distributed in the altitude gradient of the mountains of the state of Minas Gerais. Altitudinal variations modify the abiotic factors that shape the patterns of geographic isolation among populations and act as important factors in natural selection, interfering in the genetic diversity and the diversity of the chemical composition of endemic species. Because of the stretch described above, the objective of this study was to evaluate the influence of altitude on the genetic diversity and chemical composition of essential oils from *L. pinaster* populations found at different altitudes. Individuals of *Lychnophora pinaster* from five populations in two regions of the state of Minas Gerais (North and Metropolitan region of Belo Horizonte) had their essential oils analyzed, and individuals from eight populations found in three regions (North; Metropolitan region of Belo Horizonte; and Campo das Vertentes) had their genomic data analyzed by SNP markers. The main results indicated that *L. pinaster* populations have high genetic and chemical diversity. The major compounds in the essential oil were 14-hydroxy- α -humulene (GM and DI), cedr-8 (15)-en-9- α -ol (ODMa), 14-acetoxy- α -humulene (SRM), and 4-oxo-15-nor-eudesman-11-ene (SM). Furthermore, each population has a different chemical composition of essential oils, strongly determined by different abiotic factors. High altitudes (1366 m and 1498 m) found in the Metropolitan region of Belo Horizonte have suffered with higher precipitation and daytime thermal amplitude on the chemical composition of essential oils, and populations found at lower altitudes (<900 m) are strongly influenced by maximum and minimum temperatures and relative humidity. The genetic data indicate that the populations of *L. pinaster* show allelic spatial segregation, determined by the different altitudinal patterns of Minas Gerais, and altitudinal ranges of the mountains of Minas Gerais determine the genetic diversity of *L. pinaster* populations.

Keywords: arnica, essential oils, sesquiterpenes, genetics of populations, Cerrado

I - Introdução

1. Metabolismo especializado frente a altitude

A altitude atua no controle e nos padrões de diversos fatores climáticos, como por exemplo na alteração dos níveis de precipitação, na amplitude térmica diária, na qualidade e composição química do solo, na velocidade dos ventos, na pressão atmosférica, na condição da cobertura de nuvens e na intensidade de radiação (KÖRNER, 1999; ZIDORN, 2010), fatores os quais em conjunto podem alterar os aspectos morfológicos, fisiológicos, e genéticos das plantas (ANGIONI et al., 2004; RUSSELLO et al., 2015; MEENA et al., 2016; FILATOV et al., 2016; MELITO et al., 2016; SILVA, 2016; CIRAK et al., 2017). Em resposta aos fatores climáticos, as plantas sofrem ajustes moleculares e metabólicos cuja finalidade é a de evitar, tolerar ou até mesmo resistir aos fatores climáticos (SOUZA & LÜTTGE, 2015), culminando com a possibilidade de evolução química e molecular nas plantas. O metabolismo especializado das plantas sofre constantes efeitos dos fatores climáticos provocados pelo gradiente de altitude, conduzindo a diferentes alterações nos perfis químicos das espécies (ANGIONI et al., 2004; DE et al., 2015; CIRAK et al., 2017).

Populações de *Matricaria chamomilla* L., localizada em gradiente altitudinal de 590 m até 2230 m na Austrália, apresentam composição química distinta, de forma que as populações localizadas em altas altitudes apresentam perfil químico distinto das populações que crescem em baixas altitudes (GANZERA et al., 2008). Os autores ainda afirmam que há aumento de 26% na produção de flavonoides e 31% de fenóis em indivíduos localizados entre 1000m e 2000m de altitude, mostrando que flavonoides e fenóis aumentam significativamente seus teores conforme o aumento da altitude.

Extratos etanólicos de populações de *Marchantia polymorpha* L. localizadas em diferentes altitudes na Índia a oeste do Himalaia, com variação altitudinal de 5800 m a 8202 m, têm suas atividades antibacteriana e antioxidante mais pronunciadas em plantas coletadas em elevadas altitudes (DE et al., 2015). Os autores acreditam que elevadas altitudes apresentam fatores

climáticos distintos os quais contribuem para alterar o pool de metabólitos especializados da espécie analisada ao longo da faixa altitudinal.

Hypericum androsaemum L. encontrada em variações altitudinais de 113 m a 1161 m e *Hypericum polyphyllum* Boiss. & Bal. encontrada em variações de altitude entre 500 m e 3250 m na Turquia mostra que *H. androsaemum* apresentou correlação positiva entre a produção de ácido clorogênico, ácido neoclorogênico, amentoflavona, hiperocida, isoquecitrina, quecitrina e quercetina com o aumento da altitude e *H. polyphyllum* apresentou correlação positiva entre a produção de hipericina, pseudohipericina, ácido clorogênico, amentoflavona, isoquecitrina, quecitrina, rutina e quercetina com o aumento da altitude (CIRAK et al., 2017). Os autores acreditam que as baixas temperaturas e alta exposição solar encontradas nas regiões de elevadas altitudes podem ajustar a produção de metabólitos não-voláteis nessas espécies, a fim de promover defesas antioxidantes contra o excesso de luminosidade.

Dentre as diversas vias de biossíntese de metabólitos especializados nas plantas, as vias de biossíntese dos óleos essenciais são excelentes alvos de estudo pois sofrem constantemente com as variações ambientais (LORETO & SCHNITZLER, 2010). Óleos essenciais são definidos pela *Internacional Organization for Standardization* (ISO) como "...produtos obtidos a partir de matérias primas naturais de origem vegetal por destilação a vapor, por destilação a seco, ou pelo uso de processos mecânicos para o epicarpo de frutos cítricos, após a separação da fase aquosa (se houver), por processos físicos." (ISO, 2013). Os óleos essenciais geralmente apresentam caráter hidrofóbico, com baixa solubilidade em contato com a água e alta solubilidade em contato com solventes orgânicos apolares (SINGH et al., 2002; SIMÕES, 2007; LOBO et al., 2009).

Sabe-se que o metabolismo dos óleos essenciais produz inúmeras substâncias químicas necessárias à sobrevivência das plantas. Aponta-se que os fatores bióticos e abióticos são capazes de provocar oscilações metabólicas as quais são identificadas nas alterações dos perfis químicos desses óleos essenciais (ANGIONI et al., 2004; SIMÕES, 2007; LOBO et al., 2009;

PORTELLA et al., 2014; De ALMEIDA et al., 2016). Alguns fatores climáticos alteram substancialmente a composição química das plantas, como por exemplo a precipitação, temperatura, sazonalidade (PORTELLA et al., 2014; De ALMEIDA et al., 2016), as condições de solo e geológicas da região (SORO et al., 2016; YAHIA et al., 2019) e a variação na altitude (CHAUHAN et al., 2016; MELITO et al., 2016), contribuindo com o estabelecimento da espécie no ambiente.

Populações de *Rosmarinus officinalis* L. localizadas desde ao nível do mar até 1000 m de altitude na Itália apresentam variação na composição química dos óleos essenciais, cujas substâncias β -cariofileno, verbeneno, humuleno, α -terpineol, acetato de bornila e terpinoleno oscilam nas 17 estações naturais e também em quatro regiões distintas, Norte, Sul, Leste e Oeste do país (ANGIONI et al., 2004). Segundo MELITO et al (2016), populações de *Helichrysum italicum* G. Don f. encontradas ao nível do mar e em faixas de altitude entre 600 m e 1250 m apresentaram alterações na produção de substâncias dos óleos essenciais, de forma que italiceno, γ -curcumeno, α -curcumeno, nerol e geraniol apresentaram correlações positivas entre seus altos teores e elevadas altitudes, enquanto limoneno, cariofileno nerolidol e cis- β -guaieno apresentaram correlações negativas entre seus altos teores e elevadas altitudes.

É evidente que a variação da altitude modula o metabolismo especializado das plantas, contribuindo com a variação na diversidade química das espécies. Uma espécie que ocorre em diferentes altitudes deve ser investigada, uma vez que a altitude promoveria ajustes metabólicos nos indivíduos de diferentes populações. Ainda mais, algumas populações poderiam apresentar menor comunicação entre elas, fato que poderá ser amostrado na diversidade química populacional. Contudo, a diversidade química populacional não é relacionada somente com a variação de altitude, mas também com sua diversidade e estrutura genéticas. Ao investigarmos a diversidade química das espécies, devemos concomitantemente investigar a diversidade genética dessas mesmas populações.

2. Ação da altitude na diversidade e na estrutura populacional

Considera-se que múltiplos fatores regulam a diversidade genética das populações. Em especial, as taxas de migração, o aparecimento de mutações e a seleção natural regulam a dinâmica populacional nos ambientes naturais (ALLENDORF et al., 2013; SILVA, 2016). É esperado que a diversidade genética de populações acompanhe o equilíbrio de Hardy-Weinberg (MEIRMANS, 2019), mantendo a variabilidade genética da espécie através do equilíbrio das frequências alélicas e genotípicas, pelo fluxo gênico existente entre as populações e pela manutenção de heterozigotos, mantendo a variabilidade genética da espécie (SÁNCHEZ, 2008; ALLENDORF, 2013). Contudo, em populações naturais as quais sofrem com os efeitos bióticos e abióticos, com a seleção natural e com eventos mutacionais, é observado quedas no fluxo gênico entre as populações, resultando no isolamento espacial de alelos e genótipos intra e interpopulacional, comprometendo a presença de heterozigotos nas populações (SÁNCHEZ, 2008; ALLENDORF, 2013; SILVA, 2016).

Sabe-se que espécies endêmicas ocorrem somente em um determinado local (ECHTERNACHT et al., 2011; ALLENDORF, 2013), sendo fortemente selecionadas por fatores climáticos. A ação dos fatores climáticos pode causar o isolamento interpopulacional, contribuindo com a perda de variabilidade genética e aumento da divergência entre as populações, alterando a diversidade genética dessa espécie (SILVA, 2006; HABER, 2008; SILVA, 2016). Populações ficam isoladas pela ação de diferentes fatores, como por exemplo a variação de altitude (ECHTERNACHT et al., 2011; ALLENDORF, 2013). A altitude interfere na diversidade genética de várias espécies (LI et al., 2013; RUSSELLO et al., 2015; MEENA et al., 2016; FILATOV et al., 2016). Conforme apontado pelos pesquisadores, a variação de altitude provoca quedas no fluxo gênico, quedas na heterozigosidade interpopulacional, aumento no número de alelos privados entre as populações e aumento da variabilidade genética intra-populacional, indicando perda da variabilidade genética na espécie.

Com a presença do isolamento e da fragmentação populacional, a estrutura populacional é positivamente afetada, expressando a perda da variabilidade genética populacional pelo aumento de endocruzamentos (HABER, 2008). Como consequência desse processo, é esperado que as populações não se encontrem em equilíbrio genético e a espécie possa sofrer deriva genética (ALLENDORF et al., 2013; SILVA, 2016).

Uma forma de mensurar a estrutura genética das populações de uma determinada espécie é pela estimativa dos índices de fixação, ou estatísticas-F de Wright (WRIGHT, 1951; WRIGHT, 1965). O grau de diferenciação entre as populações (F_{ST}) expressa o grau de endogamia entre as populações de uma espécie, independente do sistema reprodutivo da espécie (WRIGHT, 1965). De acordo com os valores de F_{ST} , é possível descrever o grau de endogamia entre as populações, de forma que valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação genética (WRIGHT, 1978). *Medicago citrina* (Font Quer) Greuter é uma planta endêmica do oeste do mediterrâneo que apresenta forte estrutura populacional expressa pelos valores médios de F_{ST} à 0,386 (JUAN et al., 2004). Segundo os autores, os valores elevados de F_{ST} indicam alto grau de isolamento interpopulacional para *M. citrina*.

O índice de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) descreve o desvio da panmixia dentro de uma população, levando em conta o seu sistema reprodutivo (WRIGHT, 1965). Os valores de F_{IS} expressam a possibilidade de endogamia em cada população analisada, cujos valores positivos de F_{IS} indicam a presença de processos endogâmicos nas populações e valores negativos indicam que cada população está geneticamente equilibrada (PARREIRA et al., 2020). A presença de valores negativos de F_{IS} expõem o menor número de heterozigotos na população e a presença de alelos únicos com alta frequência (YUAN et al., 2018). Logo, os valores de F_{IS} inferem a perda variabilidade genética de cada população amostrada e seu grau de isolamento entre as demais populações (MONTALVO & ELLSTRAND, 2001; CORDEIRO et al., 2019).

A altitude confere fatores climáticos ímpares para cada população (MELITO et al., 2016; FILATOV et al., 2016), ocasionando variações de temperatura, intensidade luminosa, presença/ausência de polinizadores e dispersores e interferindo na diversidade e na estrutura genética populacional. Sabe-se que os fatores climáticos alteram estrutura genética populacional (KHADIVI-KHUB et al., 2014; SELSELEH et al., 2019) e a altitude contribui positivamente com a estrutura genética e com a elevação da diversidade genética (LIAN et al., 2018), aumentando a habilidade das espécies a se adaptarem aos fatores climáticos locais (ZHAO et al., 2016). Logo, é necessário amostrar a diversidade populacional e a estrutura genética dessas populações com a finalidade de apontar a variabilidade presente na espécie e se diferentes fatores, como a altitude, podem contribuir com o isolamento inter e intrapopulacional.

As técnicas denominadas ômicas têm ampla aceitação na comunidade científica, produzindo materiais científicos cuja investigação se pauta na sinalização químico-molecular das plantas em momentos de estresses ambientais (DUQUE et al., 2013), na dormência de plantas (ANDERSON, 2015), no metabolismo especializado (ZHONG, 2011; WANG et al., 2015), na conservação de espécies nativas, na evolução, na dinâmica populacional, na deriva genética, na hibridização e na especiação (EMERSON et al., 2015; RUSSELLO et al., 2015).

A construção de bibliotecas GBS (*genotyping-by-sequencing*), visando a descoberta de nucleotídeos de polimorfismo único (SNP) tem por finalidade reduzir a complexidade do genoma da espécie amostrada e promover a busca por pequenas variações que não são usualmente indicadas pelo uso de outros marcadores moleculares (ELSHIRE et al., 2011; POLAND et al., 2012). A investigação de polimorfismos em múltiplos loci de interesse via exploração de SNP aumenta substancialmente a capacidade de análise e associação entre os genes e o metabolismo (EMERSON et al., 2015; RUSSELO et al., 2015; KIM et al., 2016), como também a busca pela associação da diversidade e estrutura genéticas com a altitude.

3. *Lychnophora pinaster* Mart. e regiões de origem da espécie

O gênero *Lychnophora* (Asteraceae) abriga 35 espécies, das quais 23 são encontradas em diferentes fitofisionomias do bioma Cerrado, cujas espécies apresentam ampla variação morfológica descrita pelos portes de arvoreta, arbustos e raramente subarbustos, com ramos caulinares levemente ramificados, folhas alternas sésseis, coriáceas e com inflorescências terminais (SEMIR, 2011; de ANDRADE WAGNER et al., 2014; LOEUILLE et al., 2015; LOEUILLE et al., 2019). O gênero *Lychnophora* é quimicamente complexo, com produções de substâncias químicas das vias do metil-eritritol-fosfato (MEP), mevalonato (MVA) e via do ácido chiquímico, com grande produtividade de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e lactonas sesquiterpênicas utilizados na medicina tradicional (SEMIR, 2011).

Lychnophora pinaster Mart. (Asteraceae) se trata de uma espécie endêmica encontrada no cerrado mineiro, cujo seu estabelecimento no ambiente é ditado pelas condições físico-químicas dos solos e pela variação da altitude das serras do estado de Minas Gerais (SEMIR, 1991; SEMIR et al., 2011; SILVA, 2013; SILVA, 2016). *L. pinaster* ocorre em campos de canga e em campos rupestres localizados na Serra da Caraça, Serra das Carrancas, Serra de Curral d'El Rey, Serra do Curral, Serra d'Itabira do Campo, Serra do Itacolimi, Serra da Lapa, Serra de Lavras Novas, Serra do Mesquita, Serra da Moeda, Serra do Palmital, Serra da Piedade, Serra do Rola Moça e entre Virgem da Lapa e Serra do Cipó e nos municípios de Barbacena, Belo Horizonte, Belo Vale, Itabirito, Betim, Biribiri, Brumadinho, Cachoeira do Campo, Campos, Caraça, Carrancas, Catas Altas, Chapada Diamantina, Cidade de Minas, Congonhas do Campo, Gandarela, Grão Mogol, Itabira, Itabirito, Itamarandiba, Itumirim, Jardim Nossa Senhora das Graças, Lavras, Lavras Novas, Lavrinha, Mariana, Miguel Burner, Nova Lima, Santa Rita, São Julião, Serra do Ouro Branco e Santa Bárbara (SEMIR, 1991; SEMIR et al., 2011; SILVA, 2016). Esse conjunto de serras pode servir como arreira geo-

gráfica natural, segregando as populações de *L. pinaster* ao longo de sua história de vida, caminhando para um histórico de fenótipos químicos distintos.

O estado de Minas Gerais é geologicamente antigo, complexo e rico, cujas formações rochosas apresentam alterações desde o período pré-cambriano até o período fanerozóico, sendo geograficamente dividido em regiões, ou macrorregiões (IBGE, 1972; ALKMIM, 2018). *L. pinaster* é encontrada na região Norte do estado, na Região metropolitana de Belo Horizonte; e na região denominada Campo das Vertentes, cujas regiões apresentam características geológicas e morfológicas distintas. A região denominada Campo das Vertentes apresenta serras formadas por rochas cristalinas geologicamente antigas, mas também por plateaus com bacias sedimentares importantes para o estabelecimento de fitofisionomias do Cerrado e da Mata Atlântica (BARUQUI et al., 2006). Segundo o autor, há variação de altitude de 400 a 1300 m na região, contribuindo para o estabelecimento de espécies endêmicas.

A Região metropolitana de Belo Horizonte abriga o Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais. O Quadrilátero Ferrífero apresenta relevo muito acidentado e geologicamente complexo, sendo circundado pela Serra do Curral, com altitudes médias de 1200 m; a Serra da Moeda, com altitudes médias de 1300 m; a Serra do Caçara, conjunto de fortes escarpes com altitudes superiores a 2000 m; e a Serra de Ouro Preto, com altitudes aproximadas a 1400 m (SILVA, 2006; ALKMIM, 2018; BARROS & MAGALHÃES JUNIOR, 2018).

A grande variação de altitude no Quadrilátero Ferrífero se dá pelas características litológicas e estruturais do relevo, cuja altimetria elevada ocorre em itabiritos e quartzitos, rochas com maiores resistências a erosão (SILVA, 2006). Além disso, é sabido que esses sistemas de rochas apresentam soerguimento geologicamente antigo (superior a 541Ma), mediano (fanerozóico, de 541Ma até o presente) e recente, ocorrendo nos períodos Eoceno-Oligoceno (35-33 Ma), Mioceno (16-13 Ma), Plioceno (7 Ma) e Pleistoceno (1 Ma) (ALKMIM, 2018). A intensa erosão modificou a distribuição fitofisiológica de região, contribuindo com pressões

seletivas para o estabelecimento de campos rupestres e florestas estacionais semidecíduais, formações vegetacionais do Cerrado e da Mata Alântica (SILVA, 2006; ALKMIM, 2018).

A região Norte de Minas Gerais é composta pela Serra do Espinhaço e pela Chapada Diamantina (MEYER & FRANCESCHINELLI, 2010). A composição geológica abrange rochas constituídas de quartzitos, arenitos, filitos, itabiritos e dolomitas, cujos diversos processos erosivos promoveram a formação de solos arenosos, ácidos e com baixa capacidade de retenção de água (SEMIR, 2011). A Cadeia do Espinhaço apresenta variação de altitude entre 800 e 2000 m (ECHTERNACHT et al., 2011; SEMIR, 2011) e seu auge de soerguimento ocorreu entre 900 e 620 Ma (ALKMIM, 2018). Os mares de morros encontrados no estado de Minas Gerais podem funcionar como barreiras geográficas para as espécies vegetais, contribuindo com o aparecimento de endemismos, como é o caso do gênero *Lychnophora*.

O mapeamento dos perfis químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster* mostra que populações naturais denominadas Poço Bonito, Estrada Real e Antena de ocorrência nos Campo das Vertentes apresentaram perfil químico distinto entre elas (HABER, 2008). As populações Poço Bonito e Estrada Real apresentaram como substância majoritária o *trans*-cinamato de metila (variando de 61% a 82%) e para a população Antena o cedr-8(15)-en-9- α -ol (25,2%). Ao analisar os óleos essenciais de duas populações dos Campo das Vertentes (Carrancas-MG) e uma da Região metropolitana de Minas Gerais (Itabirito-MG), foi constatado que o *trans*-cinamato de metila é componente majoritário nas populações dos Campo das Vertentes e há ausência dessa substância na população da Região metropolitana de Belo Horizonte (SILVA, 2016). Segundo o autor, 92,7% da variação química do óleo essencial de *L. pinaster* está relacionada com a composição química do solo.

Com relação a diversidade genética de *L. pinaster*, Haber (2008), utilizando de marcadores microssatélites, registrou que as heterozigosidades observadas (H_o) foram menores que as heterozigosidades esperadas (H_e) em três populações de *L. pinaster* dos Campo das Vertentes, apontando excesso de homozigotos nas populações. A autora também observou que

não há grande variação genética entre as três populações expressa pela análise de variância molecular (AMOVA), mas a divergência gênica entre as populações é intermediária (9,43%), resultante da distância geográfica interpopulacional. Além disso, os valores de endogamia entre as populações não foram elevados. Contudo, a população de Antena apresentou elevados valores de endogamia, evidenciando que o isolamento geográfico dessa população pode contribuir com a queda no fluxo gênico entre as populações e favorecer o cruzamento entre indivíduos aparentados, diminuindo a variabilidade genética da espécie.

Silva (2016) amostrou seis populações de *L. pinaster* das regiões dos Campos das Vertentes e uma população da Região metropolitana de Belo Horizonte (Poço Bonito, Serra do Sofá, Serra da Arnica, Serra do Salto, Serra Branca, Areia Branca e Ouro Branco). O autor reporta que, dos alelos investigados nas proporções de Hardy-Weinberg, os valores de H_e foram maiores que H_o , indicando ocorrência de endogamia. Ainda segundo o autor, é necessário investigar um maior número de populações de *L. pinaster* no estado de Minas Gerais, a fim de comprovar a ação efetiva dos fatores ambientais na diversidade genética dessa espécie.

Com as informações apresentadas anteriormente, a espécie apresenta grande potencial de uso farmacológico e medicinal, cujas composições químicas dos óleos essenciais já amostradas trazem apenas uma parcela da composição química global da espécie. Além disso, a diversidade e estrutura genética de *L. pinaster* deve ser amostrada e possivelmente associada com os fatores climáticos e a altitude das serras de Minas Gerais, com a finalidade de buscar padrões químicos e genéticos da espécie os quais sirvam de gatilho para futuros estudos de conservação ambiental e biotecnologia.

Logo, é primordial examinar um maior número de populações de *L. pinaster* encontradas nas serras de Minas Gerais, fato que contribuirá com a descrição da diversidade química e genética da espécie. Diante dos resultados dos estudos anteriores, foram formuladas as seguintes perguntas: a) A altitude seria responsável por isolar as populações de *L. pinaster* ao

ponto de alterar significativamente a diversidade química e genética da espécie?; b) Há associação entre a diversidade química e genética populacional de *L. pinaster*?

De acordo com as perguntas realizadas, chegamos às seguintes hipóteses:

H₀: A altitude interfere na diversidade química e genética de *L. pinaster*; e

H₀: Há associação entre a diversidade química e genética de *L. pinaster*

II - Objetivos

a) Geral

Avaliar a interferência da altitude na diversidade genética e química de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.

b) Específicos

- Caracterizar a composição química dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster* em diferentes altitudes e fatores climáticos nas regiões de ocorrência da espécie;
- Caracterizar a diversidade genética e estrutura genética de populações de *L. pinaster* em diferentes altitudes nas regiões de ocorrência da espécie;
- Verificar se há associação entre a composição química dos óleos essenciais da espécie, a altitude e os fatores climáticos; e
- Verificar se há associação entre a diversidade e estrutura genética, composição química dos óleos essenciais da espécie, a altitude e os fatores climáticos.

III - Material e Métodos

1. Material vegetal e locais de coleta

As partes aéreas (folhas e ramos) de 141 indivíduos de oito populações naturais de *Lychnophora pinaster* foram coletadas nos anos de 2017 e 2019, cujas populações foram encontradas em um gradiente de 700 a 1498 m, distribuídas em três regiões, a região Norte (populações DI, GM e ODMa), a Região metropolitana de Belo Horizonte (populações SM e SRM) e os Campo das Vertentes (populações SA, SB e SSa) no estado de Minas Gerais, Brasil (Tabela 1, Figura 1). Os indivíduos foram etiquetados, georreferenciados e as informações da região de cada população, o número de indivíduos coletados para as análises genéticas e químicas, a altitude de cada população, o ano de coleta e as coordenadas geográficas de cada população amostrada são apresentadas na Tabela 01. A distância entre as populações variou de 8 a 571 km. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e consideramos como unidade amostral cada indivíduo de *L. pinaster* amostrado em campo.

Tabela 1. Populações de *Lychnophora pinaster*, Minas Gerais, Brasil.

Populações	Ano de Coleta	Região	Número de Indivíduos		Coordenadas Geográficas	Altitude (m)
			Análises Genéticas	Análises químicas		
Grão Mogol (GM)	Jul/2017	Norte	16	17	16°38'39.5"S; 042°57'17.1"W	859
Olhos D'Água (ODMa)	Jul/2017/2019§	Norte	15	15	17°27'37.7"S; 043°34'01"W	700
Diamantina (DI)	Jul/2017/2019§	Norte	16	16	17°31'24.9"S; 043°32'11.5"W	819
Raposos (RPS)	Jul/2017	MrBH	-	14	19°57'39.2"S; 043°45'47.4"W	969
Serra do Rola-Moça (SRM)	Jul/2017	MrBH	21	17	20°03'28.8"S; 044°01'18.8"W	1498
Serra da Moeda (SM)	Jul/2017	MrBH	25	17	20°15'31.6"S; 043°57'41.8"W	1366
Serra do Salto (SSa)	2012	CV	17	-	21°26'55.25"S; 044°38'17.54"W	1292
Serra da Arnica (SA)	2012	CV	14	-	21°26'40.56"S; 044°56'29.90"W	1055
Serra Branca (SB)	2012	CV	17	-	21°26'44.96"S; 044°35'15.95"W	1124

MrBH: Região metropolitana de Belo Horizonte; CV: Campo das Vertentes; §: as amostras de genética e química das populações DI e OMDa foram coletadas em 2017 e 2019, respectivamente.

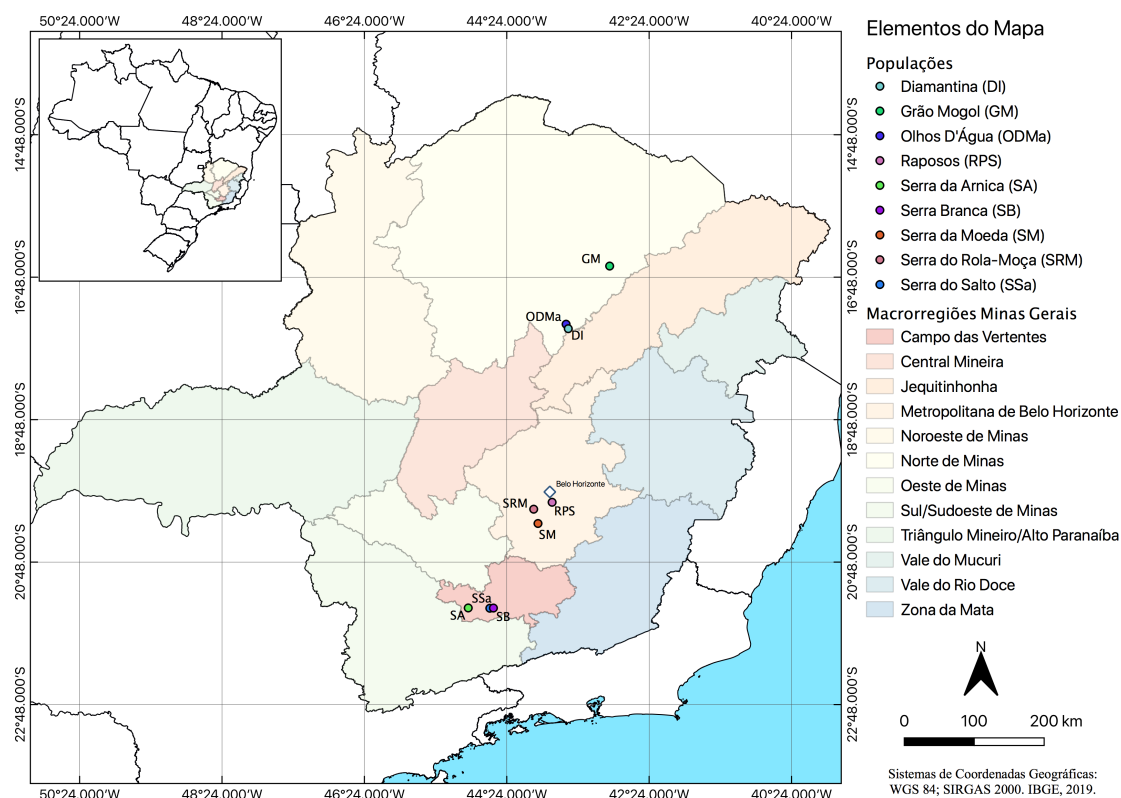


Figura 1. Localização geográfica das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. no estado de Minas Gerais, Brasil.

Com a finalidade de promover as análises genéticas e químicas neste trabalho, seguimos o fluxograma apresentado na Figura 2. O estudo genético foi conduzido com 141 indivíduos das oito populações amostradas de *L. pinaster*. As folhas de *L. pinaster* coletadas foram armazenadas, individualmente, em tubos Falcon (50 mL) contendo sílica-gel e conduzidas ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico, Campinas/SP, onde foram armazenadas a -80 °C até extração do DNA.

A caracterização da composição química dos óleos essenciais foi realizada com populações das regiões Norte e Metropolitana de Belo Horizonte, correspondendo a um total de seis populações e 96 indivíduos, uma vez que a composição dos óleos essenciais das populações de Campo das Vertentes já foi minuciosamente descrita em literatura (HABER, 2008; REIS et al., 2010; SILVA, 2013). As folhas foram separadas dos ramos e essas foram secas a temperatura ambiente e mantidas no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro

de Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico, Campinas/SP, até o processo de extração dos óleos essenciais das folhas.

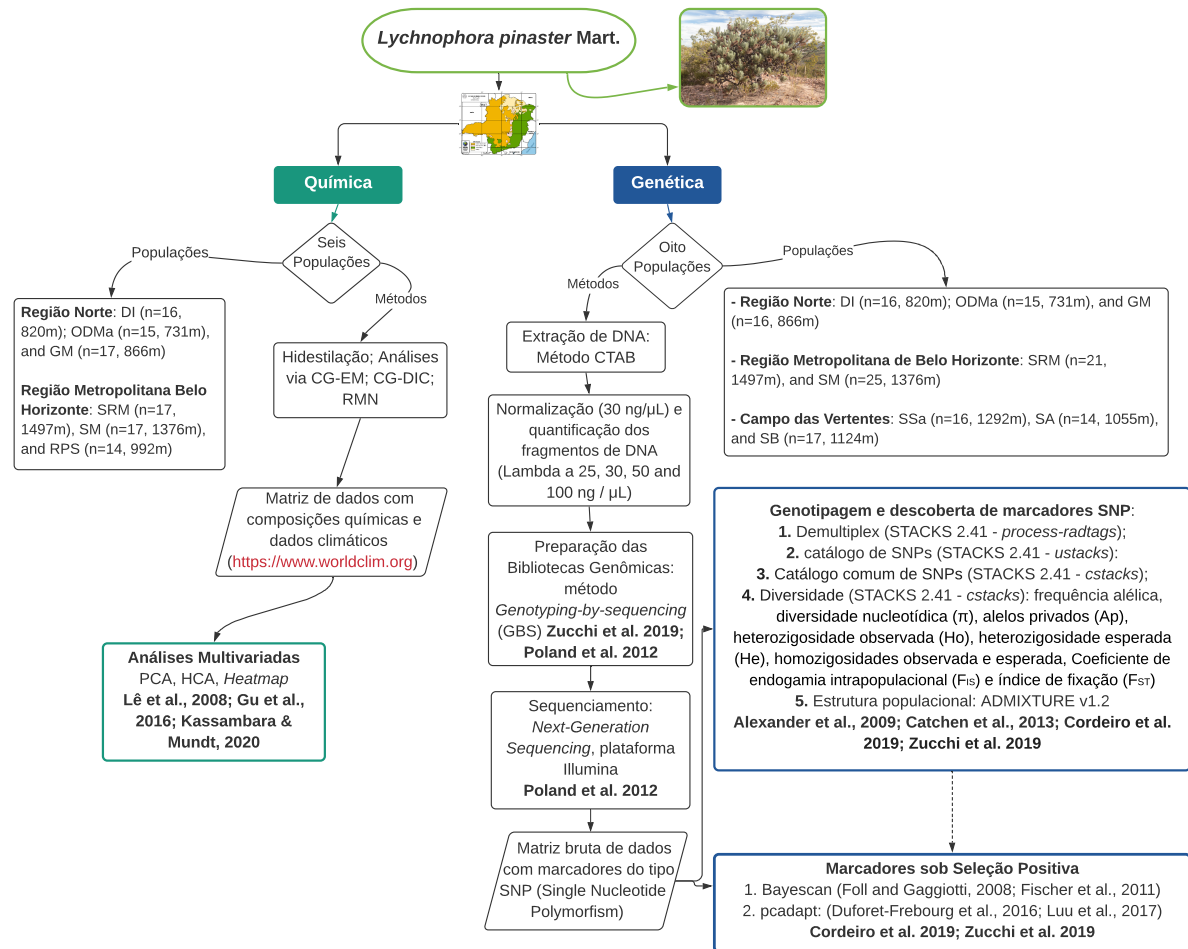


Figura 2. Fluxograma dos métodos desenvolvidos.

A identificação taxonômica da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. João Semir do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e pelo Prof. Dr. Marcelo Monge do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. As exsiccatas foram depositadas no herbário UEC da Universidade Estadual de Campinas (UEC 179320, 179321, 179322, 208036, 208026, 208030, 208028, 208032 e 208038). A coleta do material vegetal foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente (ICMBio: 22772- 6; SisGen/MMA: A01F803) e pelo Instituto Florestal do estado de Minas Gerais (autorizações 005/2017 e 006/2017).

2. Análises dos óleos essenciais

As análises da composição química dos óleos essenciais foram realizadas para seis populações de *L. pinaster*, que são: Diamantina (DI, n=16, altitude $\cong$ 819 m); Olhos D'Água (ODMa, n=15, altitude $\cong$ 700 m); Grão-Mogol (GM, n=17, altitude $\cong$ 859 m); Raposos (RPS, n=14, altitude $\cong$ 969 m); Serra do Rola-Moça (SRM, n=17, altitude $\cong$ 1498 m); e Serra da Moeda (SM, n=17, altitude $\cong$ 1366 m).

2.1. Extração dos óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais localizado Instituto Agrônomo (IAC).

As partes aéreas (ramos e folhas) de *L. pinaster* coletadas em campo foram trazidas para o laboratório e as folhas foram manualmente separadas dos ramos. Os óleos essenciais das folhas de *L. pinaster* foram extraídos por hidrodessolidação via aparato Clevenger durante duas horas, após pré-testes de otimização no tempo de extração. O rendimento dos óleos essenciais foi calculado em base seca, de forma que foram retiradas no momento da extração três alíquotas de folhas (1grama/porção) para cada indivíduo, e essas foram secas em estufa de circulação de ar forçada à 40°C até atingir massa constante. Os óleos essenciais foram conservados em freezer a -20 °C até a análise de suas composições químicas.

2.2. Identificação das substâncias químicas dos óleos essenciais

2.2.1. Cromatografia em fase gasosa (CG-EM e CG-DIC)

As análises qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais foram realizadas Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais localizado no Instituto Agrônomo (IAC). A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas

(CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70 eV), com coluna capilar de sílica DB - 5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) acoplada ao sistema, hélio como gás de arraste (1.0 mL/min). Para cada amostra, o volume de injeção no CG-EM foi de 1 μ L da solução (1 μ L de óleo essencial dissolvido em 1 mL de acetato de etila). Os parâmetros implementados durante a análise foram: injetor a 220 °C; linha de transferência a 240 °C, split 1/20; e rampa de temperatura 60 °C – 240 °C, 3 °C/min (MARQUES et al., 2020). A identificação dos constituintes químicos foi realizada pela comparação dos espectros de massas das substâncias com base de dados do sistema GC-EM (Nist 62.lib) e índice de retenção linear encontrados na literatura (ADAMS, 2017). O índice de retenção linear foi obtido pela injeção de uma mistura de n-alcanos (C9-C24), usando da equação descrita por van Den Dool & Kratz (VAN DEN DOOL, KRATZ, 1963). A análise quantitativa dos óleos essenciais foi realizada via cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010/AOC-20i) pelo uso do método de normalização de área. As condições das análises cromatográficas empregadas em CG-DIC foram as mesmas realizadas nas análises qualitativas descritas acima para o cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM).

2.2.2. Isolamento de substâncias e análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (RMN 1H) e Carbono (RMN ^{13}C)

A análise de Ressonância Magnética Nuclear de 1H e ^{13}C foi realizada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob supervisão da Dra. Maria da Paz Lima.

A amostra de óleo essencial da população Serra da Moeda (SM) foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), para o isolamento de um sesquiterpeno não identificado. O óleo essencial do indivíduo com os maiores teores da substância detectada via CG-DIC (60 mg) foi diluído em acetato de etila (grau cromatográfico) e aplicado em cromatoplasas de sílica 60 F254 (20 x 20, Merck) e esta eluída com a mistura clorofórmio e acetato de etila (95:5) por três vezes. A substância foi extraída da sílica por meio da mistura de

metanol e diclorometano (PA Merck) e a solução concentrada em rotaevaporador. A substância isolada foi injetada no sistema CG-EM para avaliação do grau de pureza e obtenção dos espectros de massas. A seguir foram obtidos os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono-13 (RMN ^{13}C) uni-(1D) e bidimensional (2D). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , unidimensional (1D), foram obtidos em espectrômetro Brucker Inova 300 (^1H :500 MHz; ^{13}C :125 MHz), utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna ou o sinal do solvente. Os espectros 2D (HMQC: correlação Heteronuclear múltipla Quantum; HMBC: correlação Heteronuclear múltipla-Bond) foram obtidos em espectrômetro Brucker FOURIER 300, utilizando como solvente CDCl_3 .

2.3. Análises Genéticas

As análises genéticas deste trabalho foram baseadas em oito populações de *L. pinaster* que são Diamantina (DI, n=16, altitude $\cong$ 819 m); Olhos D'Água (ODMa, n=15, altitude $\cong$ 700 m); Grão-Mogol (GM, n=16, altitude $\cong$ 859 m); Serra do Rola-Moça (SRM, n=21, altitude $\cong$ 1498 m); Serra da Moeda (SM, n=25, altitude $\cong$ 1366 m); Serra do Salto (SSa, 17, altitude $\cong$ 1292 m); Serra da Arnica (SA, n=14, altitude $\cong$ 1055 m); e Serra Branca (SB, n=17, altitude $\cong$ 1124 m). A extração de DNA, a preparação das bibliotecas genômicas pelo método *Genotyping-by-Sequencing* (GBS), o sequenciamento do tipo *Next-Generation Sequencing* (NGS); e o processamento de dados para análises de genética populacional foram realizadas em parceria com o Departamento de Genética da Universidade de Campinas (Unicamp), a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (Esalq/USP) e a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pólo de Piracicaba-SP, sob supervisão da Dra. Maria Imaculada Zucchi.

2.3.1. Extração de DNA

O método CTAB foi aplicado para realizar a extração de DNA das amostras (DOYLE 1990; SILVA, 2016). Os 141 indivíduos de *L. pinaster* tiveram seu DNA extraído neste trabalho, de forma que para cada indivíduo foi utilizado 10 mg de folhas trituradas à consistência de pó e cada amostra foi adicionada a um Eppendorf contendo 1 mL de solução-tampão de extração CTAB 2 % a 65 °C (água Milli-Q 100 mM; TRIS-HCl 100 mM; pH 8,0; NaCl 1,42 mM; CTAB 2 %; EDTA 20 mM pH 8,0; β-mercaptoetanol 0.2 %; PVP 2 %). As amostras foram colocadas em banho-maria à 65 °C por 60 minutos, com intervalos de 15 minutos para agitação das amostras. Após o procedimento acima, foi adicionado a cada amostra 900 µL de chloroformio-isoamil (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para outro Eppendorf e foi adicionado 500 µL de isopropanol; o mesmo Eppendorf foi colocado em freezer a temperatura de -20 °C durante 30 minutos e depois centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. O precipitado, ou pellet, foi deixado para secar em bancada a temperatura ambiente, depois lavado com 500 µL de etanol 70 % e centrifugado a 12000 rpm por sete minutos. Após secagem do precipitado, o mesmo foi novamente lavado com 500 µL de etanol 95 % e centrifugado a 12000 rpm por sete minutos. Os precipitados finais foram ressuspensos com 60 µL de solução-tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0; e 2 µL RNase (10 mg/mL)). As amostras foram levadas a banho-maria por 37 °C durante 60 minutos e deixadas para secar em overnight à temperatura ambiente. O material genético extraído foi armazenado em biofreezer a -80 °C até seu uso.

2.3.2. Quantificação e Normalização de DNA

A quantificação do DNA por amostra foi realizada pela observação em eletroforese com gel de agarose utilizando SYBERtm Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) após passagem do gel em transiluminador ultravioleta e pela comparação com concentrações

conhecidas de fago Lambda (25, 30, 50 and 100 ng/ μ L). As amostras de DNA foram normalizadas a 20 ng/ μ L e purificadas com o kit QIAquick PCR Purification of Qiagen®.

2.3.3. *Preparação das Bibliotecas Genômicas*

A produção das bibliotecas genômicas via *Genotyping-by-sequencing* (GBS) foi realizada em parceria com o Departamento de Genética da Universidade de Campinas (Unicamp), a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (Esalq/USP) e a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pólo de Piracicaba-SP, sob supervisão da Dra. Maria Imaculada Zucchi.

O protocolo da construção das bibliotecas genômicas GBS foi realizado de acordo com as informações no trabalho de Poland et al (2012), seguido por modificações encontradas no trabalho de Zucchi et al (2019). Foram utilizados 20 ng/ μ L de DNA de cada indivíduo, o qual foi normalizado a 10 μ L, cujas amostras foram distribuídas em placas contendo 96 poços. Cada poço da placa apresenta adaptadores comuns e adaptadores do tipo barcode, sendo eles utilizados nas análises a posteriori. O primeiro estágio no protocolo GBS se trata da reação de Restrição, com a adição de 2,0 μ L de solução tampão NEB 4; 0,4 μ L PstI-HF (20 U/ μ L); 0,4 μ L MspI (20 U/ μ L); e 10,2 μ L de água Milli-Q. O segundo passo da reação de GBS se trata da reação de Ligação, com a adição de 2,0 μ L de solução-tampão NEB 4; 1,0 μ L ATP (10 mM); 0,5 μ L T4 DNA Ligase (200 U/ μ L); 11,5 μ L de água Milli-Q. O terceiro passo se trata da condução de PCR Multiplex com o seguinte programa de temperatura: 16 ciclos a 95 °C por 10 s, 62 °C por 20 s, 72 °C por 30 s; 72 °C por 5 min; 4 °C indefinidamente. O sequenciamento do tipo Next-Generation Sequencing (NGS) das 141 amostras foi realizado em plataforma Illumina pelo Illumina Miseq, com fragmentos de tamanho de 90 nt de comprimento.

Os Adaptadores Barcode (Adaptador 1) utilizados neste experimento apresentam as seguintes sequências: 5' CACGACGCTCTCCGATCTXXXXTGCA GNNNNNNN 3' e

3' GTGCTGCGAGAAGGCTAGAXXXXXX ACGTCNNNNNNN 5' (bot XXXXXagatcgga-agagcgtcgtg e top cacgacgctcttccgatctXXXXXtgca). Os adaptadores comuns (Adaptador 2) foram desenhados para a segunda enzima de restrição, para a confecção da sequência pair-end. O Adaptador 2 apresenta formato de Y, fato que previne auto-anelamento uma vez que o iniciador reverse (iniciador A2R) pode ser anelado somente quando o iniciador forward (iniciador A1) já estiver estendido após ação da enzima de restrição PstI no sítio de restrição do Adaptador 1. O adaptador 3 apresenta extremidade coesiva com terminação 5'-CG para o sítio de restrição MspI.

O adaptador 2 (PE) para a enzima de restrição MspI (C | CGG) apresenta as seguintes sequências: 5' nnnnnnnnC CGAGATCGGAAGAGCGGGGACTTTAAGC e 3' nnnnnnnnGGC TCTAGCCTTCTCGCCAAGTCGTCCTTACGGCTCTGGCTAG (Adpt2PE_top_cg: cgAGATCGGAAGAGCGGGGACTTTAAGC e Adpt2PE_bot: GATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT).

Os iniciadores Illumina, ou primers, foram os mesmos oligos encontrados nas placas com 96 poços, com sequências complementares ao adaptador 1 (forward) e ao adaptador 2 (reverse) para um sequenciamento pair-end. (IlluminaF_PE (Tm=70) 58 pb (Tm=57)): AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCT e IlluminaR_PE (Tm=70) 46 pb (Tm=62): CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAA).

2.3.4. Genotipagem de descoberta de marcadores SNP

Os procedimentos de demultiplex, construção dos loci RAD, descoberta e anotação dos marcadores SNP foram conduzidos via pipeline no STACKS v.2.45 (CATCHEN et al., 2013; CORDEIRO et al., 2019; ZUCCHI et al., 2019), sob a supervisão da Dra. Maria Imaculada Zucchi e do Dr. Erick Mauricio Goes Cordeiro. As reads obtidas das amostras de DNA de *L. pinaster* foram, primeiramente, demultiplexadas utilizando o software *radtags* e individuali-

zadas em diferentes arquivos no formato *fastq* baseadas nos *barcodes* (6-8pb) de cada amostra. Deversos filtros foram aplicados nessa primeira etapa com a finalidade de selecionar os reads das amostras com alta qualidade. Dentre os filtros, foram aplicados o filtro de score de qualidade (-q), o filtro para eliminação de leituras com função baseada em não-chamada (-c) e a função que impede a seleção de barcodes com mais de um mismatch (-r). Após esse procedimento, as sequências com comprimento de 90pb foram selecionadas e sequências com baixa qualidade foram descartadas.

A segunda etapa da genotipagem consistiu na construção de um catálogo de SNP pelo uso do software *ustacks*. Neste software, foi aplicado o método de novo para a seleção de SNP pois a espécie não apresenta genoma de referência, seguido dos seguintes parâmetros: distância máxima permitida entre as pilhas, ou *stacks* (M=2); distância máxima permitida para alinhamentos secundários (N=4, M + 2); e cobertura mínima com três sequências para cada locus RAD (m=3). A terceira etapa consistiu na criação de um catálogo comum de SNP pelo uso do software *cstacks*. Durante esse processo, não foi permitido uma diferença maior do que dois (2) entre um mesmo loci, com a finalidade de impedir sobreposição de loci. Além disso, cada marcador do tipo SNP deve estar presente em pelo menos 60 % do total de amostras (-r 0,5), com frequência mínima restrita a 5 % e heterozigosidade observada limitada ao máximo de 75 %. Os demais módulos do pipeline STACKS foram utilizados no módulo default.

2.3.5. Diversidade Genética e Estrutura Genética

Os procedimentos para a descrição da diversidade genética das populações de *L. pinaster* foram realizadas via STACKS v.2.45, utilizando o software *ctacks* (CORDEIRO et al., 2019; ZUCCHI et al., 2019), conduzidos sob a supervisão da Dra. Maria Imaculada Zucchi e do Dr. Erick Mauricio Goes Cordeiro. A diversidade nucleotídica (π), os alelos privados (A_p), a frequência alélica dos alelos mais frequentes por locus (P), a heterozigosidade observada (H_o), a heterozigosidade esperada (H_e), a homozigosidade observada, a homozigosidade es-

perada, o coeficiente de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) e o índice de fixação (F_{ST}) foram estimados via software *cstacks*. Para a descrição da estrutura populacional, o software ADMIXTURE v1.2 foi utilizado, cujo melhor valor de K que descreve o clusters genéticos das populações de *L. pinaster* foi implementado via método de validação cruzada, ou cross-validation (ALEXANDER et al., 2009).

2.3.6. Descrição de SNP sob seleção positiva

A abordagem bayesiana pelo software BayeScan (FOLL & GAGGIOTTI, 2008; FISCHER et al., 2011) e o modelo PCAdapt (LUU et al., 2017; ZUCCHI et al., 2019) foram escolhidos para identificar SNP sob seleção positiva.

A abordagem Bayesiana é capaz de identificar a frequência alélica de diferentes populações e indicar quais loci estão sob seleção neutra e quais estão sob seleção positiva de acordo com a distância geográfica entre as populações (FOLL & GAGGIOTTI, 2008; ZUCCHI et al., 2019). O modelo se trata de uma regressão logística baseada nos valores do índice de fixação (F_{ST}), sendo capaz de dividir os efeitos genotípicos de loci neutros e loci sob seleção positiva, estabelecendo valores de frequência para cada marcador.

A segunda abordagem para detectar marcadores SNP sob seleção positiva foi o método PCAdapt implementado pelo pacote *pcadapt* via software R (LUU et al., 2017). Esse modelo faz uso dos valores de F_{ST} calculado pelos marcadores SNP que compõem a estrutura populacional, indicando quais marcadores são neutros e quais estão sob seleção positiva (LUU et al., 2017; ZUCCHI et al., 2019). O modelo PCAdapt expressa uma PCA que mostra como os marcadores SNP podem promover o processo de seleção nas populações estudadas.

2.3.7. Dados climáticos e fatores climáticos

A fim de analisar os efeitos dos fatores climáticos sob a composição química dos óleos essenciais, montamos uma matriz de dados com nove variáveis climáticas que correspondem

aos fatores climáticos. As variáveis são: altitude (alt), cobertura de nuvens (cld), variação diurna de temperatura (dtr), temperatura máxima (tmx), temperatura mínima (tmn), evapotranspiração (pet), precipitação (pre), pressão de vapor (vap) e umidade relativa (wet). As médias mensais das variáveis cld, dtr, tmx, tmn, pet, pre, vap e wet foram coletadas de acordo com o mês e ano de coleta de cada população (Tabela 1), sendo as variáveis climáticas obtidas via dados CRU TS v.4.04 depositados no website worldclim.org (HARRIS et al., 2020). As variáveis climáticas foram obtidas pelo pacote *raster* (HIJMANS, 2020) implementados via software *R* (R versão 4.0.2).

2.2.8. Análises Estatísticas

O presente estudo foi condicionado segundo delineamento totalmente causalizado, considerando os indivíduos de cada população como unidade amostral. Para analisar os dados químicos, os valores do rendimento de extração dos óleos essenciais de cada indivíduo foram submetidos à análise de *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$) com teste de *Dunn* ($p < 0,05$) com correção de Bonferroni, desenvolvida via pacote *stats* utilizado no software *R* (R versão 4.0.2) com o propósito de encontrar relações entre o rendimento dos óleos essenciais, as regiões e as populações de *L. pinaster*. Os valores dos rendimentos de extração e de altitude (m) de cada indivíduo foram submetidos a análise de correlação com ranking de *Kendall* (R, $p < 0,05$), desenvolvida via pacote *stats* utilizado no software *R*, com a finalidade de descrever a influência da altitude sobre o rendimento dos óleos essenciais de *L. pinaster*.

Com a finalidade de observar os padrões químicos dos óleos essenciais sob influência da altitude e dos fatores climáticos, foi montada uma matriz de dados que contempla a composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *L. pinaster*, os fatores climáticos e os valores de altitude. Essa matriz de dados foi normalizada e submetida a análise de componentes principais (ACP) pelo pacote *FactoMineR* (LÊ et al., 2008), análise hierárquica de Cluster (AHC) com Distância Euclideana e enlaçe de Ward pelo pacote *factoextra* (KASSAMBARA

& MUNDT, 2020) e análise de heatmap pelo pacote *ComplexHeatmap* com a mesma configuração da AHC (GU et al., 2016). As análises acima foram desenvolvidas no software *R*.

Para analisar os dados genéticos, foram realizados testes de Mantel (R , $p < 0,05$) com o uso do pacote *ade4* (DRAY & DUFOUR, 2007) entre as matrizes das distâncias geográficas (ROSENMAI, 2014) e das distâncias genéticas expressas pelos índices de fixação (F_{ST}) de cada população. O mesmo procedimento foi adotado com os valores de altitude, comparado via teste de Mantel (R , $p < 0,05$) os valores de altitude e as distâncias genéticas expressas pelos índices de fixação (F_{ST}) de cada população. O cálculo da diversidade genética, da estrutura genética expressa pelos valores ótimos de K e da descoberta de SNPs sob seleção positiva já foram descritos nos tópicos anteriores (“2.3.5. *Diversidade Genética e Estrutura Genética*” e “2.3.6. *Descrição de SNP sob seleção positiva*”).

IV - Resultados

1. Rendimento dos óleos essenciais

O rendimento dos óleos essenciais (%) não apresentou relação com as regiões de origem, sendo a população de RPS ($0,22 \pm 0,04$) apresentando os maiores valores de rendimento, seguida por ODMa ($0,18 \pm 0,11$), SM ($0,11 \pm 0,05$), SRM ($0,08 \pm 0,08$), GM ($0,05 \pm 0,02$) e DI ($0,05 \pm 0,02$) (Tabela 2). A análise de *Kruskal-Wallis* indicou que as populações DI, GM e SRM apresentaram os menores valores no rendimento dos óleos essenciais quando comparado com as populações ODMA, RPS e SM. Além disso, os resultados de rendimento dos óleos essenciais também mostraram que as populações de *L. pinaster* amostradas apresentaram grande variação inter e intrapopulacional (Figura 3).

A análise de correlação pelo ranking de *Kendall* (Figura 4) expressou baixa correlação entre o rendimento de produção dos óleos essenciais e a altitude ($R=-0,026$, $p=0.69$), mostrando que a altitude não é fator de influência no rendimento dos óleos essenciais para as populações de *Lychnophora pinaster*.

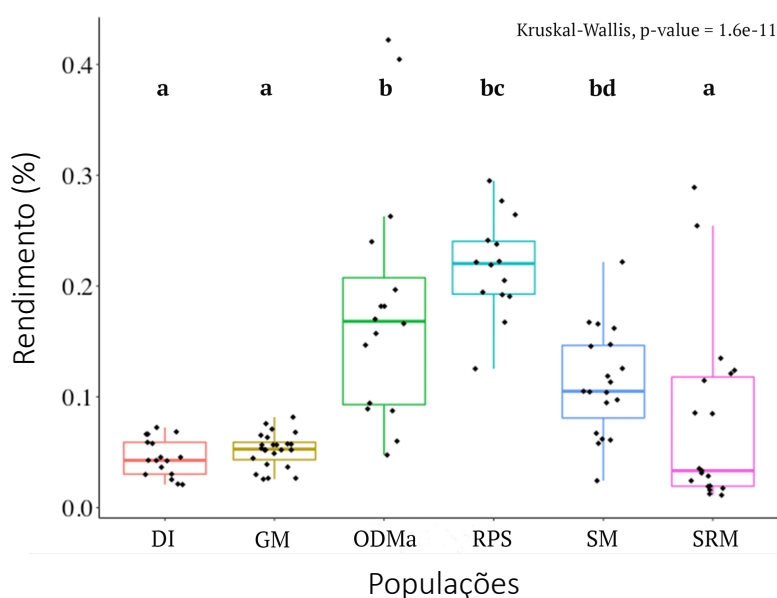


Figura 3. Rendimento de produção dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. Os valores do rendimento de extração foram submetidos a análise *Kruskal-Wallis* ($p=1,6.10^{-11}$). As letras minúsculas representam as múltiplas comparações expressas pelo teste de Dunn

($p > 0,05$) com correção de Bonferroni. Os pontos em cada boxplot indicam o número e distribuição dos indivíduos de cada população. Diamantina (DI, $0,05 \pm 0,02$, $n=17$); Grão Mogol (GM, $0,05 \pm 0,02$, $n=24$); Olhos D'Água (ODMa, $0,18 \pm 0,11$, $n=16$); Raposos (RPS, $0,22 \pm 0,04$, $n=14$); Serra da Moeda (SM, $0,11 \pm 0,05$, $n=19$); e Serra do Rola-Moça (SRM, $0,08 \pm 0,08$, $n=19$).

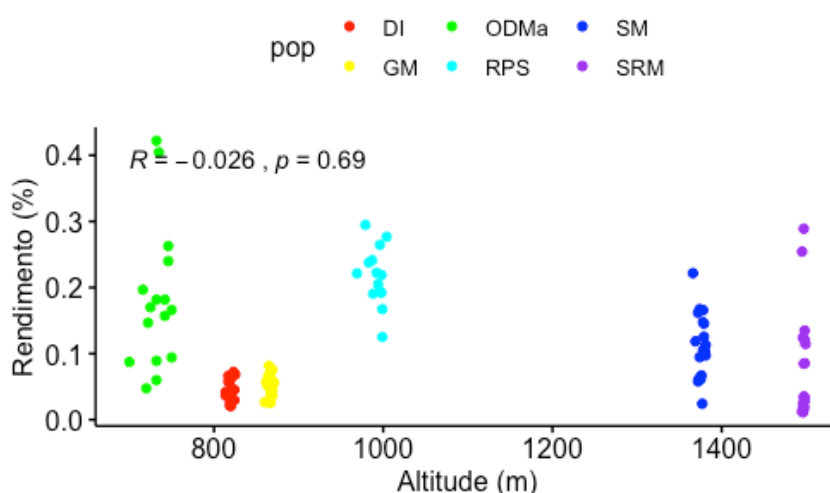


Figura 4. Análise de correlação entre as altitudes (m) e o rendimento de produção dos óleos essenciais (%) de cada indivíduo das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. Correlação de Kendall ($R = -0,02640$ e $p = -0.6866$).

2. Composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* se encontra na Tabela 2. Foram detectadas 58 substâncias, com a identificação de 54 substâncias encontradas entre as seis populações de *L. pinaster* analisadas neste trabalho. Foram identificadas, em média, $81,8 \pm 10,7$ % das substâncias encontradas nas seis populações avaliadas. A exceção foi a população de Serra da Moeda, com o valor de 60,66 % do total de substâncias identificadas. Essas substâncias não identificadas pertencem a classe dos sesquiterpenos, segundo o padrão de fragmentação de seus espectros de massas.

Cada população apresenta composição química diferencial em seus óleos essenciais, com poucas substâncias que co-ocorrem entre todas as populações de uma mesma região, como é o caso somente de linalol, *allo*-epóxido de aromadendreno e α -humuleno, as únicas três substâncias presentes nas três populações da região norte (ODMa, DI e GM) e somente 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno, o qual está presente em cinco das seis populações analisadas (ODMa, DI, SRM, SM e RPS).

Para as populações da região Norte, as substâncias majoritárias da população DI são linalol (19,96 %), 14-hidróxi- α -humuleno (29,94 %), germacrona (9,42 %), sesquiterpeno 1 (4,0 %) e sesquiterpeno 2 (7,31 %). Para a população ODMa as substâncias majoritárias são linalol (8,35 %), *Z*-nerolidol (18,09 %), *allo*-epóxido de aromadendreno (11,66 %), cedr-8(15)-en-9- α -ol (22,31 %), 14-hidróxi-(*Z*)-cariofileno (8,79 %). Para a população GM, as substâncias majoritárias são α -pineno (13,2 %), β -pineno (5,32 %) e 14-hidróxi- α -humuleno (35,95 %).

Para as populações da Região metropolitana de Belo Horizonte, as substâncias majoritárias da população RPS são β -pineno (6,01 %), 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno (27,72 %), 14-acetóxi- α -humuleno (11,94 %) e o sesquiterpeno 4 (14,69 %). Para a população SM, as substâncias majoritárias são sesquiterpeno 4 (9,05 %) e 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno (35,45 %). A substância 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno encontrada em maior abundância nas populações SM e RPS e em menor abundância nas populações SRM, DI e ODMa, isolada por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e analisada por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C) e Hidrogênio (RMN ^1H) unidimensional (1D) e bidimensional (2D). Os dados de Ressonância Magnética Nuclear se encontram no tópico “**IX-Anexos**”. Para a população SRM, as substâncias majoritárias são 14-acetóxi- α -humuleno (60,88 %), viridiflorol (4,37 %) e acetato de (2*E*)-tridecenol (4,59 %).

Tabela 2. Composição química média (%) dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster*, Minas Gerais, Brasil.

Substância	Norte			Região metropolitana de Belo Horizonte			IRL calc	IRL lit
	Diamantina (DI) 819 m	Olhos D'água (ODMa) 700 m	Grão-Mogol (GM) 859 m	Serra do Rola- Moça (SRM) 1498 m	Serra da Moeda (SM) 1366 m	Raposos (RPS) 969 m		
α -tujeno	-	-	-	-	0,31	-	923	930
α -pineno	-	-	13,20	-	0,69	1,14	932	939
4Z-hepten-1-ol	-	0,14	-	-	-	-	958	966
etil-3-metil pentanoato	-	-	-	-	0,19	-	958	956
sabineno	-	-	-	-	0,64	-	969	975
β -pineno	-	-	5,32	-	1,30	6,01	974	979
<i>trans</i> -dehidróxi óxido de linalool	0,03	-	-	-	-	-	991	993
<i>o</i> -cimeno	-	-	-	-	1,47	-	1020	1026
limoneno	-	-	-	tr	0,55	tr	1025	1029
1,8-cineol	-	-	-	-	-	0,22	1028	1031
terpineno	-	-	-	-	0,41	-	1054	1059
terpinoleno	-	-	-	-	0,18	-	1084	1088
linalol	19,96	8,35	3,36	-	0,41	tr	1095	1096
<i>n</i> -nonanal	-	-	0,70	0,65	-	0,36	1100	1100
<i>trans</i> -pinocarveol	-	-	5,40	-	0,40	-	1133	1139
<i>iso</i> -3-tujanol	-	-	-	-	-	3,29	1134	1138
pinocarvona	-	-	-	-	-	0,55	1157	1164
terpinen-4-ol	-	-	3,23	-	2,64	-	1171	1177
α -terpineol	-	-	-	-	0,10	-	1185	1188
mirtenal	-	-	1,47	-	0,31	-	1191	1190
mirtenol	-	-	-	-	-	3,87	1191	1195
<i>n</i> -decanal	-	-	0,89	0,47	-	-	1200	1201
<i>trans</i> -acetato de pinocarvila	-	-	-	-	-	0,51	1294	1298
undecanal	-	-	-	0,64	-	-	1301	1306
<i>cis</i> -acetato de pinocarvila	-	-	-	-	-	0,46	1319	1326
acetato de geranila	-	-	-	0,55	-	-	1377	1381

β -elemeno	-	-	-	0,51	-	-	1386	1390
α -cipereno	-	-	-	0,98	2,50	-	1393	1398
<i>cis</i> -cariofileno	-	2,79	-	0,48	-	-	1412	1408
<i>trans</i> -cariofileno	-	-	3,60	-	0,74	-	1412	1419
β -farneseno	-	-	-	-	-	1,90	1443	1442
α -humuleno	3,06	0,31	0,37	2,36	-	-	1446	1454
cumacreno	-	-	-	3,42	-	-	1490	1472
tridecanal	-	-	-	1,01	-	-	1501	1510
4-oxo-15-nor-eudesmano-11-eno	1,10	4,72	-	3,10	35,45	27,72	1504	-
Z-nerolidol	1,39	18,09	-	1,31	-	7,27	1528	1532
sesquiterpeno 1	4,00	-	-	2,55	-	-	1542	-
1,10-decanediol	-	-	-	0,50	-	-	1543	1549
α -copaen-11-ol	-	-	1,44	-	-	-	1531	1541
<i>epi</i> -longipinanol	1,25	-	-	-	-	-	1566	1563
óxido de cariofileno	-	3,96	-	-	-	-	1572	1583
espatulenol	-	-	4,39	-	-	-	1573	1578
β -copaen-4 α -ol	-	-	-	-	0,65	-	1595	1590
sesquiterpeno 2	7,31	-	-	-	-	-	1598	-
viridiflorol	-	-	-	4,37	-	-	1599	1592
sesquiterpeno 3	1,75	-	-	-	-	-	1635	-
<i>allo</i> -epóxido de aromadendreno	0,47	11,66	1,95	-	-	3,51	1639	1641
cedr-8(15)-en-9- α -ol	-	22,31	-	-	-	-	1655	1651
14-hidróxi- <i>trans</i> -cariofileno	-	8,79	-	-	-	-	1665	1667
14-hidróxi-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-cariofileno	-	2,59	-	-	2,39	-	1671	1669
germacrona	9,42	0,26	-	2,84	-	-	1688	1693
14-hidróxi- α -humuleno	29,94	-	35,95	0,45	-	-	1700	1714
acetato de (2 <i>E</i>)-tridecenol	-	-	-	4,05	-	-	1703	1703
14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno	2,28	0,76	-	-	-	-	1708	1706
benzoato de benzila	0,58	-	-	1,37	-	-	1751	1760
γ -curcumen-15-al	-	1,56	-	-	-	-	1775	1768
sesquiterpeno 4	-	-	-	-	9,05	14,69	1776	-
14-acetóxi- α -humuleno	2,81	-	-	60,88	-	11,94	1801	-

Total identificado	85,33	86,28	83,91	91,03	60,66	83,43		
Hidrocarbonetos monoterpênicos	0,00	0,00	18,52	0,55	5,55	7,15		
Monoterpenos oxigenados	0,03	0,00	10,10	0,00	3,45	8,90		
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	3,06	3,10	3,97	7,75	3,24	1,90		
Sesquiterpenos oxigenados	49,24	74,7	43,73	74,79	38,49	50,44		
Rendimento (%)	0,05 ± 0,02	0,18 ± 0,11	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,08	0,11 ± 0,05	0,22 ± 0,04		

IRL calc: índice de retenção linear calculado; IRL lit: índice de retenção linear encontrado em literatura (ADAMS, 2017).

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada com a finalidade de verificar a presença de padrões da composição química e rendimento dos óleos essenciais sob a ação de fatores climáticos e da altitude (Figura 5; Tabela 3; Tabela 4).

Tabela 3. Média dos valores dos fatores climáticos das populações de *L. pinaster* localizadas nas regiões Norte e metropolitana de Belo Horizonte (MrBH), Minas Gerais, Brasil.

Fatores Climáticos	Região Norte			Região metropolitana de Belo Horizonte		
	Grão-Mogol (GM)	Olhos D'Água (ODMa)	Diamantina (DI)	Serra do Rola-Moça (SRM)	Serra da Moeda (SM)	Raposos (RPS)
cobertura de nuvens (% cld)	55	48,8	50	46,3	48,8	47,5
variação diurna de temperatura (°C, dtr)	12,8	13,7	13,2	15,7	12,8	12,5
evapotranspiração (% pet)	2,9	3,1	2,9	2,5	2,3	2,4
precipitação (mm, pre)	0,2	0	0,2	1,8	8,5	5
temperatura mínima (°C, tmn)	13,4	13,4	12,9	9,6	9,9	11,6
temperatura máxima (°C, tmx)	26,2	27,1	26,1	25,3	22,7	24,1
temperatura média (°C, tmp)	19,8	20,2	19,5	17,4	16,3	17,8
pressão de vapor (% vap)	15,2	15,2	15,4	14,3	13,7	14,5
umidade relativa (% wet)	1,82	2,77	2,22	0,39	1,82	1,18

Tabela 4. Valores de correlação de cada componente principal.

Variáveis	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
α -tujeno	-0.47360965	0.437922775	0.079076574	0.365673702	0.24308898
α -pineno	0.23560784	0.274525962	0.493014371	-0.419095922	0.14293252
4Z-hepten-1-ol	0.21624569	0.019880170	-0.253094742	0.074102316	0.15030270
etil-3-metil pentanoato	-0.36386887	0.316126629	0.034745237	0.257364732	0.14773209
sabineno	-0.57008045	0.515301124	0.085243688	0.417899386	0.27146900
β -pineno	-0.01518608	0.389754731	0.202371372	-0.556436111	-0.17673841
trans-dehidróxi óxido de linalool	0.12097163	-0.045100939	0.081314339	0.200638270	-0.18047558
o-cimeno	-0.60167727	0.536555536	0.083181736	0.429302050	0.27386953
limoneno	-0.54196194	0.479218904	0.071242697	0.377721350	0.24023798
1,8-cineol	-0.08414746	0.065571800	-0.160424322	-0.201838604	-0.26062243
terpineno	-0.49175195	0.461105995	0.088401172	0.381995938	0.26384558
terpinoleno	-0.44365629	0.409637666	0.067606827	0.342178606	0.22434863
linalol	0.54667802	-0.075609132	0.100589060	0.536732852	-0.30849641
n-nonanal	-0.22000621	-0.353987299	0.038084142	-0.441277922	-0.05914687
trans-pinocarveol	0.24187235	0.274475522	0.550900375	-0.376414844	0.22492255
iso-3-tujanol	-0.20241624	0.163343626	-0.370280874	-0.475527149	-0.59124477
pinocarvona	-0.21180517	0.171791983	-0.386098379	-0.497457444	-0.61707403
terpinen-4-ol	-0.20901890	0.624243155	0.544523692	-0.031671608	0.38619500

α -terpineol	-0.44696824	0.429688539	0.091139912	0.352996141	0.25647314
mirtenal	-0.17960388	0.143988858	-0.333855687	-0.424319302	-0.53136515
mirtenol	0.17762940	0.257961911	0.482253761	-0.313114423	0.21259881
<i>n</i> -decanal	0.18528774	0.103214862	0.382163140	-0.305990402	0.14586140
<i>trans</i> -acetato de pinocarvila	-0.15585643	0.123760961	-0.284971644	-0.371414186	-0.46410699
undecanal	-0.10178878	-0.226622018	0.027055419	-0.072832274	0.07153155
<i>cis</i> -acetato de pinocarvila	-0.17958286	0.142781507	-0.331378606	-0.428679317	-0.53699110
acetato de geranila	-0.35263106	-0.778782738	0.072852646	-0.107397036	0.25244224
β -elemeno	-0.20940763	-0.460524953	0.043631458	-0.060910871	0.15849124
α -cipereno	-0.56133499	0.315492357	0.041602596	0.278920734	0.18662099
<i>cis</i> -cariofileno	0.47732978	0.015462768	-0.662692871	0.092476256	0.47281611
<i>trans</i> -cariofileno	0.20302267	0.358500256	0.603795392	-0.371774185	0.24797948
β -farneseno	-0.22145219	0.178012927	-0.396880573	-0.508824279	-0.62708882
α -humuleno	0.08273780	-0.672550517	0.220064306	0.407067725	-0.20076947
cumacreno	-0.20790271	-0.478622794	0.048884423	-0.038580940	0.15705788
tridecanal	-0.33298077	-0.715072009	0.053449788	-0.106169962	0.23567436
4-oxo-15 nor-eudesmano-11-eno	-0.66540356	0.499897456	-0.302993102	-0.002921922	-0.20557276
<i>Z</i> -nerolidol	0.40894519	0.107292095	-0.734510352	-0.033634756	0.13389825
sesquiterpeno 1	0.36337183	-0.172086642	0.252643630	0.634151722	-0.55457038
α -copaen-11-ol	0.35387537	0.268433174	0.639461591	-0.489495152	0.23352114
1,10-decanediol	-0.33161304	-0.706674956	0.055372183	-0.109362350	0.22709746
<i>epi</i> -longipinanol	0.33362297	-0.157123233	0.230310899	0.588169212	-0.51347823
espatulenol	0.36033734	0.274296648	0.654401693	-0.499307741	0.23369613
óxido de cariofileno	0.50607828	0.062635815	-0.673462047	0.102676588	0.45491321
β -copaen-4 α -ol	-0.35132948	0.268098053	0.015544031	0.178286567	0.08566135
viridiflorol	-0.37062151	-0.800052849	0.069864053	-0.110851776	0.25147087
sesquiterpeno 2	0.35690989	-0.175351376	0.256792838	0.612010582	-0.53697499
sesquiterpeno 3	0.36113813	-0.169016416	0.252714966	0.627973407	-0.55071104
<i>allo</i> -epóxido de aromadendreno	0.52771679	0.149779900	-0.720235864	-0.092907928	0.30488852
cedr-8(15)-en-9- α -ol	0.48797723	0.059707386	-0.645142700	0.096524096	0.45251325
14-hidróxi- <i>trans</i> -cariofileno	0.47469234	0.061464199	-0.633994943	0.082830175	0.44330030
14-hidróxi-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-cariofileno	0.58045416	0.211819562	-0.050686414	-0.252775515	0.46478171
germacrona	0.25621206	-0.429374387	0.263455983	0.583109973	-0.44652299
acetato de (2 <i>E</i>)-tridecenol	-0.29071806	-0.653827665	0.071175322	-0.071260962	0.19635515
14-hidróxi- α -humuleno	0.54760960	0.099945667	0.695215371	0.013257538	-0.18054684
14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno	0.43856667	-0.115743498	0.021247149	0.552626849	-0.33569663
benzoato de benzila	-0.17122984	-0.679909727	0.145087042	0.108554246	0.02406563
γ -curcumen-15-al	0.40872515	0.049882072	-0.548553427	0.086777219	0.36606397
sesquiterpeno 4	-0.54315651	0.435319419	-0.330453924	-0.244830470	-0.44568586
14-acetóxi- α -humuleno	-0.40946303	-0.798037705	0.008118364	-0.184716810	0.12981306
altitude	-0.89226890	-0.328030308	0.129262374	0.014313786	0.21344924
cobertura de nuvens	0.54219296	0.461125198	0.631173845	-0.195169946	0.10929847
Variação de temperatura diária	-0.16779467	-0.877258540	-0.058488058	0.046285217	0.39503800
Potencial de evapotranspiração	0.96181843	-0.051898302	-0.003686908	0.107227600	0.19887094
precipitação	-0.84086560	0.441970647	-0.138856353	0.070108636	-0.09814886

Temperatura mínima	0.93459018	0.287624343	0.024942833	-0.070981947	-0.09279041
Temperatura máxima	0.89174869	-0.340266014	-0.016413006	-0.042755373	0.19318078
Temperatura média	0.97844062	-0.005799267	0.018195746	-0.054867519	0.04551539
Pressão de vapor	0.95139666	-0.099084355	0.110867611	0.006174238	-0.14880407
umidade relativa diária	0.66240315	0.551721397	-0.197763940	0.413600562	0.09471213
Rendimento de produção de OE	-0.24510807	0.216052190	-0.598395592	-0.288215592	-0.09992416

As componentes principais da ACP descreveram 37,9% de variação total nos dados. De acordo com a avaliação dos resultados apresentados pela ACP, a composição química dos óleos essenciais das populações DI, GM ODMA são influenciadas pelas mínimas temperaturas, máximas temperaturas, temperaturas médias, pressão de vapor, potencial de evapotranspiração e umidade relativa diária. Apontamos que esses fatores climáticos contribuíram com a determinação da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster*. Além disso, as populações localizadas na Região metropolitana de Belo Horizonte (MrBH) têm seus perfis químicos dos óleos essenciais influenciados por elevadas altitudes (1498 m e 1366 m), como mostrado pela ACP (Figura 5). A cobertura de nuvens pode ter auxiliado na alteração da composição química dos óleos essenciais na população de SRM e a precipitação poderia auxiliar nas alterações da composição química dos óleos essenciais na população de SM. A ACP também mostrou que a população RPS a composição química dos óleos essenciais não sofre influência de nenhum fator climático.

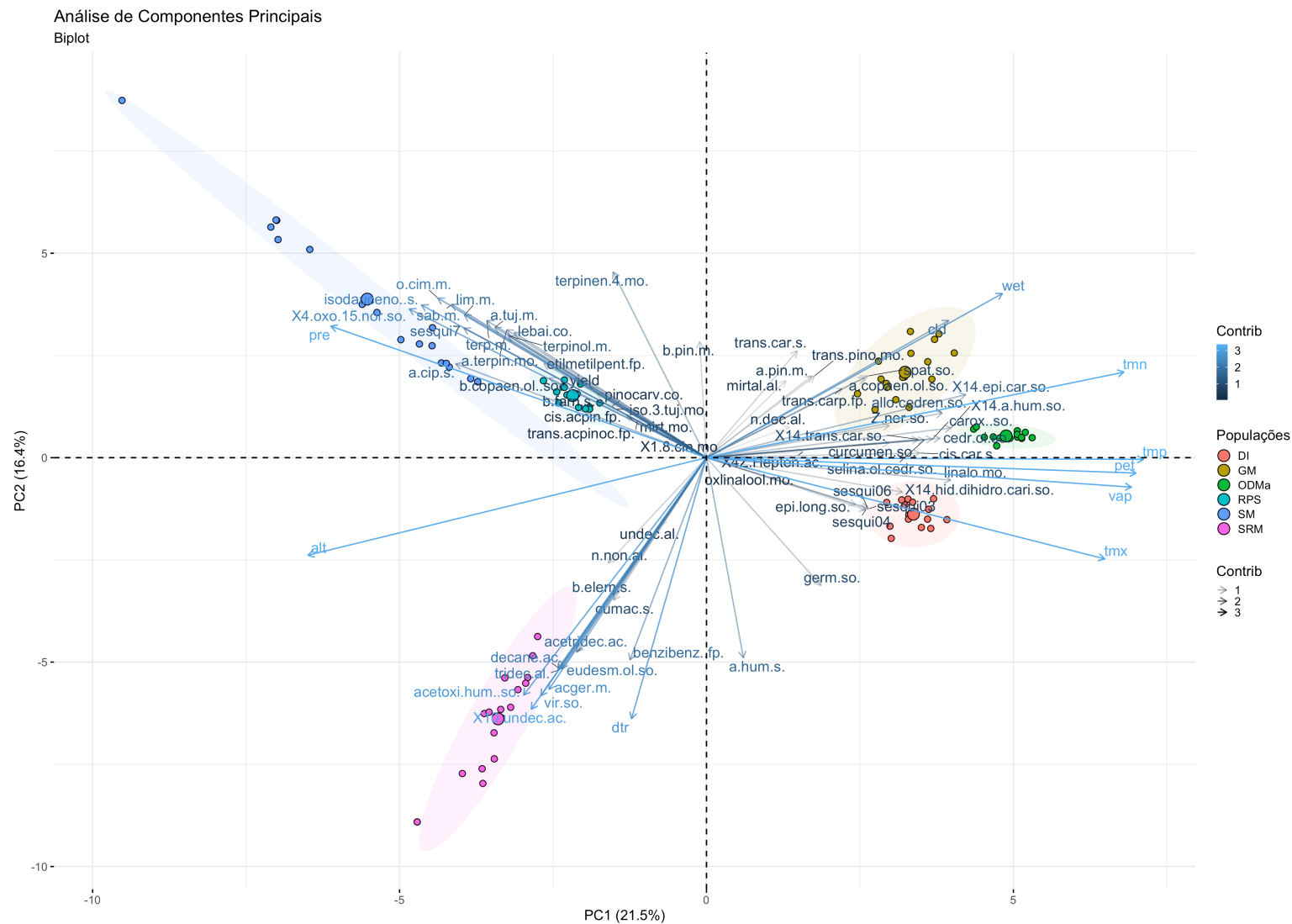


Figura 5. Análise de componentes principais da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* frente os fatores climáticos. a.tuj.m.: α -tujeno; a.pin.m.: α -pineno; X4Z.Hepten.ac.: 4Z-Hepten-1-ol; etilmetilpent.fp.: etil-3-metil pentanoato; sab.m.: sabineno; b.pin.m.: β -pineno; oxlinalool.mo.:

óxido de dehidróxi-*trans*-linalol; o.cim.m.: *o*-cimeno; lim.m.: limoneno; X1.8.cin.mo.: 1,8-cineol; terp.m.: terpineno; terpinol.m.: terpinoleno; linalo.mo.: linalol; n.non.al.: *n*-nonanal; trans.pino.mo.: *trans*-pinocarveol; iso.3.tuj.mo.: *iso*-3-tujanol; pinocarv.co.: pinocarvona; terpinen.4.mo.: terpinen-4-ol; a.terpin.mo.: α -terpineol; mirt.mo.: mirtenol; mirtal.al.: mirtenal; n.dec.al.: *n*-decanal; trans.acpinoc.fp.: acetado de *trans*-pinocarvila; undec.al.: undecanal; cis.acpin.fp.: acetato de *cis*-pinocarvila; acger.m.: acetato de geranil; b.elem.s.: β -elemeno; a.cip.s.: α -cipereno; cis.car.s.: *cis*-cariofileno; trans.car.s.: *trans*-cariofileno; b.farn.s.: β -farneseno; a.hum.s.: α -humuleno; cumac.s.: cumacreno; tridec.al.: tridecanal; X4.oxo.15.nor.so.: 4-oxo-15-*nor*-eudesman-11-eno; Z.ner.so.: *Z*-nerolidol; sesqui03: sesquiterpeno 1; a.copaen.ol.so.: α -copaen-11-ol; decane.ac.: 1,10-decanediol; epi.long.so.: epi-longipinanol; spat.so.: espatulenol; carox..so.: óxido de cariofileno; b.copaen.ol..so.: β -copaen-4 α -ol; vir.so.: viridiflorol; trans.carp.fp.: *trans*-carpacina; sesqui04: sesquiterpeno 2; sesqui06: sesquiterpeno 3; allo.cedren.so.: *allo*-epóxido de aromadendreno; selina.ol.cedr.so.: cedr-8(15)-en-9- α -ol; X14.trans.car.so.: 14-hidróxi-(*Z*)-cariofileno; X14.epi.car.so.: 14-hidroxi-9-*epi*-(*E*)-cariofileno; germ.so.: germacrona; eudesm.ol.so.: eudesm-7(11)-en-4-ol; acetridec.ac.: acetato de (*2E*)-tridecenol; X14.a.hum.so.: 14-hidróxi- α -humuleno; X14.hid.dihidro.cari.so.: 14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno; benzibenz..fp.: benzoato de benzila; curcumen.so.: γ -curcumen-15-al; sesqui7: sesquiterpeno 4; acetoxi.hum..so.: 14-acetóxi- α -humuleno; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária; yield: rendimento dos óleos essenciais.

Ainda que os fatores climáticos promovam impactos na composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster*, a análise hierárquica de Cluster (AHC, Figura 6) e a análise de *heatmap* (Figura 7) demonstraram que as seis populações de *L. pinaster* são quimicamente distintas. Segundo a análise de *heatmap*, A população GM se diferencia das demais pelos teores de *trans*-pinocarveol, α -pineno, *trans*-cariofileno, espatulenol e α -copaen-11-ol. A população DI se diferencia das demais pelas altas produções de sesquiterpenos 1, 2 e 3, *epi*-longipinanol, linalol e 14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno. ODMa se diferencia das demais pelos teores de cedr-8(15)-en-9- α -ol, *allo*-epóxido de aromadendreno, óxido de cariofileno, *cis*-cariofileno, 14-hidróxi-(*Z*)- cariofileno, *Z*-nerolidol e γ -curcumen-15-al.

Segundo a análise de *hetamap* (Figura 7), a população RPS se diferencia das demais pelos altos teores de acetato de *trans*-pinocarvila, acetato de *cis*-pinocarvila, 1,8-cineol, *iso*-3-tujanol, pinocarvona, mirtenol e β -farneseno. SRM se diferencia das demais pelos altos teores de β -elemeno, cumacreno, acetato de (*2E*)-undecenol, 1,10-decaneciol, 14-acetóxi- α -humuleno, tridecanal, viridiflorol e acetato de geranila. A população SM se diferencia das demais pelos elevados teores de terpinoleno, α -tujeno, β -copaen-4 α -ol, undecanal, 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno, etil-3-metil pentanoato, α -terpineol, terpineno, limoneno, sabineno, o-cimeno, n-nonanal, isodauceno e sesquiterpeno 4.

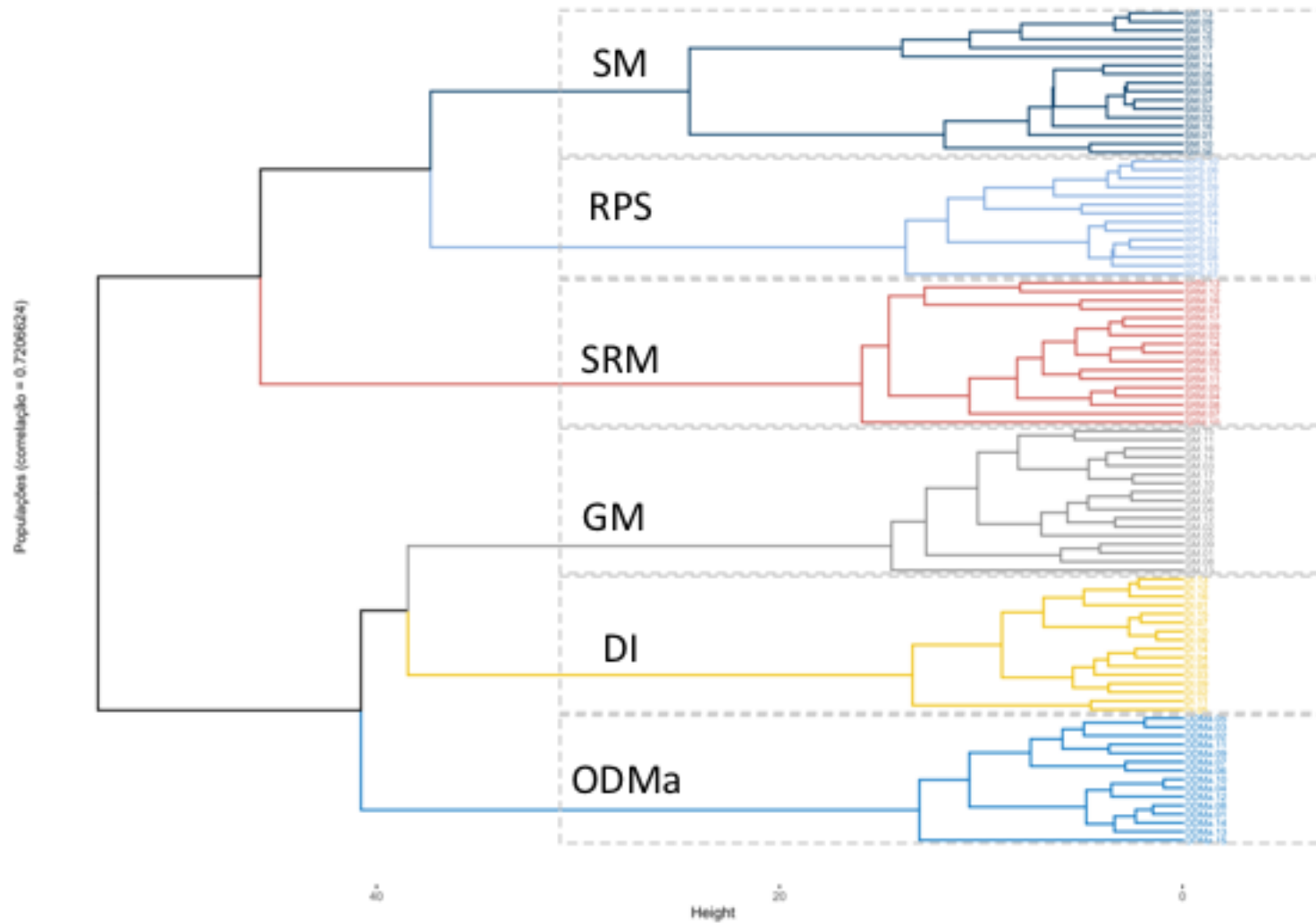


Figura 6. Análise hierárquica de Cluster (AHC) das populações de *L. pinaster*. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; RPS: Raposos; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça. A AHC foi realizada com Distância Euclideana e enlace de Ward.

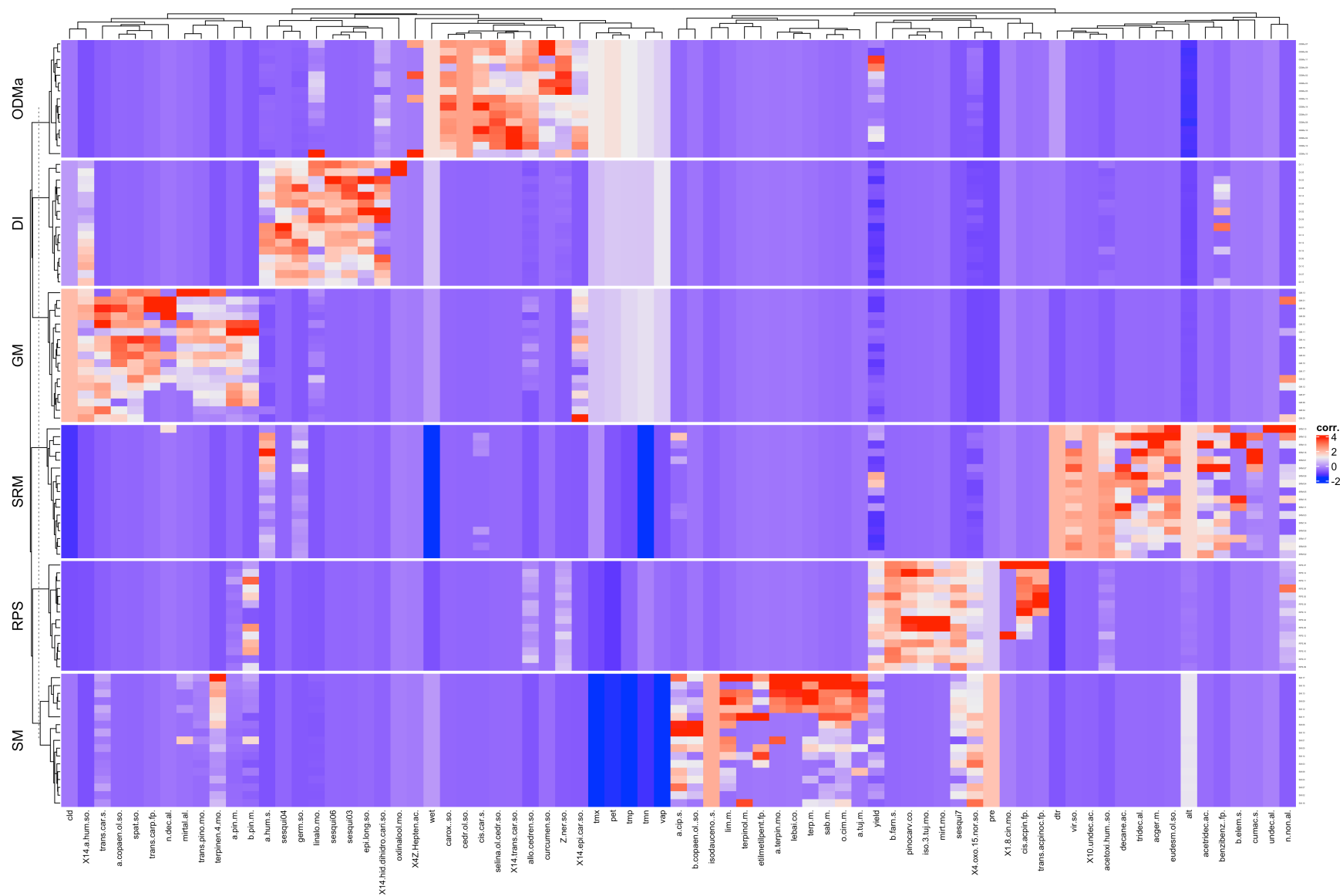


Figura 7. Análise de *heatmap* da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* frente aos fatores climáticos. a.tuj.m.: α -tujeno; a.pin.m.: α -pineno; X4Z-Hepten.ac.: 4Z-Hepten-1-ol; etilmetilpent.fp.: etil-3-metil pentanoato; sab.m.: sabineno; b.pin.m.: β -pineno; oxlinalool.mo.: óxido de de-

hidróxi-*trans*-linalol; o.cim.m.: *o*-cimeno; lim.m.: limoneno; X1.8.cin.mo.: 1,8-cineol; terp.m.: terpineno; terpinol.m.: terpinoleno; linalo.mo.: linalol; n.non.al.: *n*-nonanal; trans.pino.mo.: *trans*-pinocarveol; iso.3.tuj.mo.: *iso*-3-tujanol; pinocarv.co.: pinocarvona; terpinen.4.mo.: terpinen-4-ol; a.terpin.mo.: α -terpineol; mirt.mo.: mirtenol; mirtal.al.: mirtenal; n.dec.al.: *n*-decanal; trans.acpinoc.fp.: acetado de *trans*-pinocarvila; undec.al.: undecanal; cis.acpin.fp.: acetato de *cis*-pinocarvila; acger.m.: acetato de geranil; b.elem.s.: β -elemeno; a.cip.s.: α -cipereno; cis.car.s.: *cis*-cariofileno; trans.car.s.: *trans*-cariofileno; b.farn.s.: β -farneseno; a.hum.s.: α -humuleno; cumac.s.: cumacreno; tridec.al.: tridecanal; X4.oxo.15.nor.so.: 4-oxo-15-*nor*-eudesman-11-eno; Z.ner.so.: *Z*-nerolidol; sesqui03: sesquiterpeno 1; a.copaen.ol.so.: α -copaen-11-ol; decane.ac.: 1,10-decanediol; epi.long.so.: epi-longipinanol; spat.so.: espatulenol; carox..so.: óxido de cariofileno; b.copaen.ol..so.: β -copaen-4 α -ol; vir.so.: viridiflorol; trans.carp.fp.: *trans*-carpacina; sesqui04: sesquiterpeno 2; sesqui06: sesquiterpeno 3; allo.cedren.so.: *allo*-epóxido de aromadendreno; selina.ol.cedr.so.: cedr-8(15)-en-9- α -ol; X14.trans.car.so.: 14-hidróxi-(*Z*)-cariofileno; X14.epi.car.so.: 14-hidroxi-9-*epi*-(*E*)-cariofileno; germ.so.: germacrona; eudesm.ol.so.: eudesm-7(11)-en-4-ol; acetridec.ac.: acetato de (*2E*)-tridecenol; X14.a.hum.so.: 14-hidróxi- α -humuleno; X14.hid.dihidro.cari.so.: 14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno; benzibenz..fp.: benzoato de benzila; curcumen.so.: γ -curcumen-15-al; sesqui7: sesquiterpeno 4; acetoxi.hum..so.: 14-acetóxi- α -humuleno; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária; yield: rendimento dos óleos essenciais; alt: altitude; cld: cobertura de nuvens; dtr: variação de temperatura diária; pet: potencial de evapotranspiração; pre: precipitação; tmn: temperatura mínima; tmp: temperatura média; tmx: temperatura máxima; vap: pressão de vapor; wet: umidade relativa diária.

3. Descoberta de SNP e Processamento de Dados

As bibliotecas GBS reteram um total de 1173904 loci durante o processamento de dados realizado nos passos de demultiplexação e checagem de qualidade de reads. Após filtragem dos dados, segundo os métodos já descritos (item “2.3.4. Genotipagem de descoberta de marcadores SNP” do tópico Material e Métodos), foram encontrados um total de 29731 loci contendo marcadores SNP de alta qualidade com 91,00pb (stdev $\pm$ 0,02, gstacks). Esses marcadores foram utilizados nas análises de diversidade genética e de estrutura genética das populações de *L. pinaster*, como também na busca por marcadores sob seleção positiva e correlações de Mantel entre as matrizes genéticas, de distâncias geográficas e altitudes.

4. Diversidade Genética

Nossos resultados demonstraram que *L. pinaster* apresenta elevada diversidade genética interpoblacional. As heterozigosidades (H_o e H_e) são estimadas com a finalidade de observar se as populações de uma espécie estão em equilíbrio genético, segundo as premissas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (MEIRMANS, 2019). Os valores de heterozigosidade observadas têm valores semelhantes as heterozigosidade esperadas (Tabela 5), indicando que os alelos que estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Além disso, a diversidade nucleotídica interfere na variação genética e no grau de polimorfismos genéticos entre as populações. Nossos resultados mostram que todas as populações de *L. pinaster* apresentam baixos valores de diversidade nucleotídica, indicando que *L. pinaster* passa por processos de fragmentação populacional sob efeito de barreiras geográficas.

Os valores do coeficiente de endogamia intrapoblacional (F_{IS}) indicam a possibilidade de endogamia em cada população analisada, cujos valores positivos de F_{IS} indicam a presença de processos endogâmicos nas populações, e valores negativos indicam que cada população está geneticamente equilibrada (PARREIRA et al., 2020). Nossos resultados mostram que apenas as populações DI e SRM apresentaram valores positivos de F_{IS} , enquanto as de-

mais populações expressam valores negativos para essa variável. Também verificamos que as populações de *L. pinaster* têm altos valores nas frequências alélicas dos alelos mais frequentes por locus (P), indicando maior número de homozigotos em detrimento ao de heterozigotos. Podemos indicar que o baixo número de heterozigotos, da diversidade nucleotídica, e dos valores de F_{IS} inferem que a estrutura geográfica das regiões amostradas pode ser fator que contribui com a seleção de alelos nas populações de *L. pinaster*, exprimindo a grande diversidade interpopulacional encontrada em nossos resultados.

Tabela 5. Diversidade genética das populações de *L. pinaster*, Minas Gerais, Brasil.

Diversidade Genética	Ap	P	π	Ho	He	Hom. Obs.	Hom. Esp.	F_{IS}
DI	34	$0,92 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$	$0,89 \pm 0,00$	$0,90 \pm 0,00$	$0,014 \pm 0,02$
GM	20	$0,95 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,92 \pm 0,00$	$0,94 \pm 0,00$	$-0,002 \pm 0,01$
ODMa	1	$0,92 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$	$0,88 \pm 0,00$	$0,90 \pm 0,00$	$-0,013 \pm 0,01$
SM	498	$0,90 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,00$	$0,86 \pm 0,00$	$0,87 \pm 0,00$	$-0,007 \pm 0,02$
SRM	153	$0,91 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,00$	$0,86 \pm 0,00$	$0,87 \pm 0,00$	$0,007 \pm 0,02$
SA	25	$0,92 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$	$0,87 \pm 0,00$	$0,90 \pm 0,00$	$-0,028 \pm 0,01$
SB	65	$0,91 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	$0,86 \pm 0,00$	$0,89 \pm 0,00$	$-0,038 \pm 0,01$
SSa	24	$0,92 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$	$0,88 \pm 0,00$	$0,90 \pm 0,00$	$-0,022 \pm 0,02$

Ap: alelos privados; P: Frequência alélica dos alelos mais frequentes por locus; π : diversidade nucleotídica; Ho: Heterozigosidade observada; He: Heterozigosidade esperada; Hom. obs.: homozigosidade observada; Hom. esp.: homozigosidade esperada; F_{IS} : Coeficiente de endogamia intrapopulacional; DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.

5. Estrutura Genética

As populações de *L. pinaster* apresentaram grande diferenciação genética segundo os valores de F_{ST} (0,06-0,52), expressado pelo número total de marcadores SNP (Figura 8). Os valores de F_{ST} par-a-par foram pequenos quando comparamos populações de uma mesma região, mas se elevaram quando comparamos populações de regiões diferentes. A avaliação do índice de fixação mostrou que essas populações estão espacialmente divididas de acordo com as regiões as quais estão localizadas.

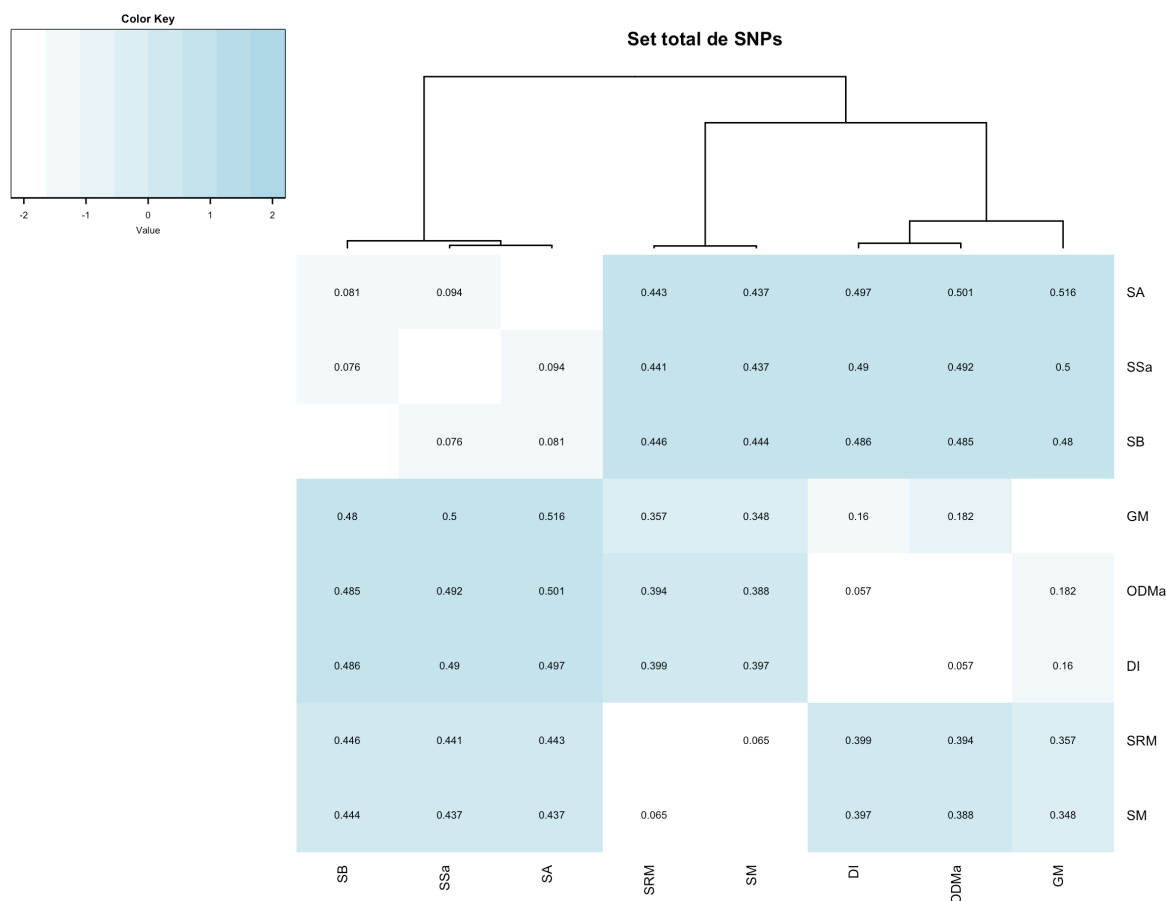


Figura 8. Dendrograma e *heatmap* da expressão da divergência populacional de *L. pinaster* baseada no índice de fixação (FST) de Wright. O índice de fixação foi baseado no set completo de marcadores SNP entre as populações de *L. pinaster*. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.

A análise de estrutura genética das populações de *L. pinaster* realizada pelo software ADMIXTURE v1.2 indicou que o valor de $K=5$ foi o responsável por melhor estimar a estruturação populacional de *L. pinaster* (Figura 9).

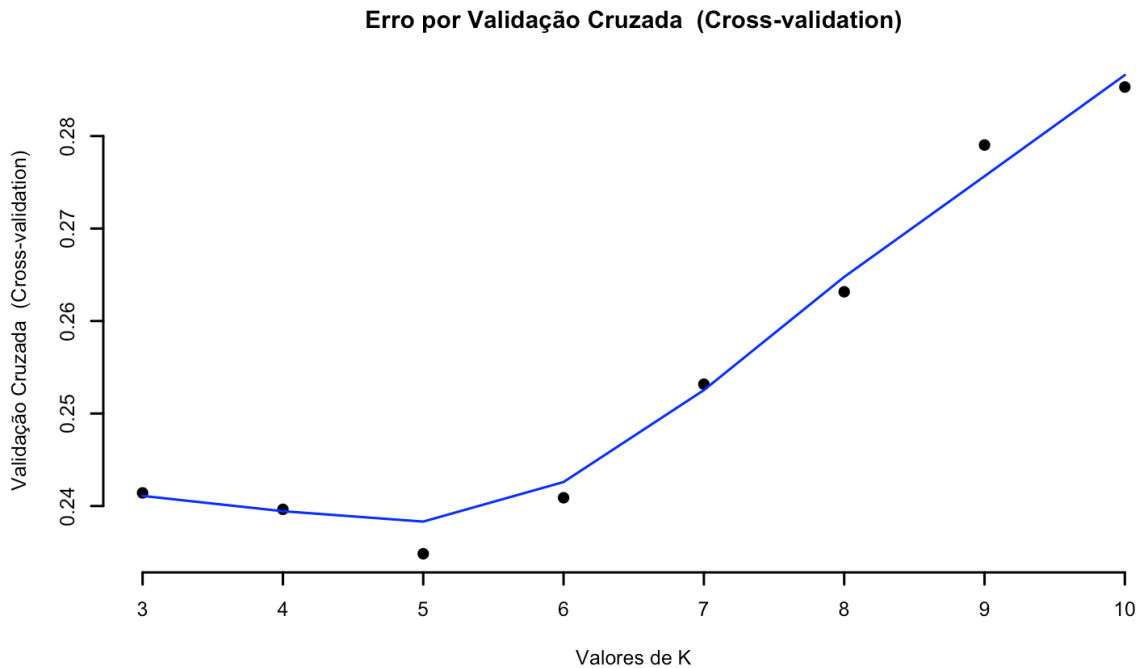


Figura 9. Análise de erro por validação cruzada (*cross-validation*) que descreve o melhor valor de *K* para a estruturação das populações de *L. pinaster* estudadas.

Segundo a análise de estrutura genética, a região Norte (populações DI, ODMa e GM) foi classificada como um único grupo genético, indicando fluxo genético entre essas três populações (Figura 10). Contudo a Região metropolitana de Belo Horizonte apresentou forte estruturação populacional, mostrando que as populações SM e SRM apresentaram constituições genéticas distintas entre si. Além disso, Campo das Vertentes também apresentou forte estruturação genética. A população SB localizada em Campo das Vertentes é geneticamente distinta da população SSa e a população SA correspondeu a uma mistura genética das populações SB e SSa. Os dados de estrutura genética também indicam que as elevadas altitudes (1498 m e 1366 m) encontradas na Região metropolitana de Belo Horizonte poderiam influenciar na divisão espacial de alelos entre as populações analisadas.

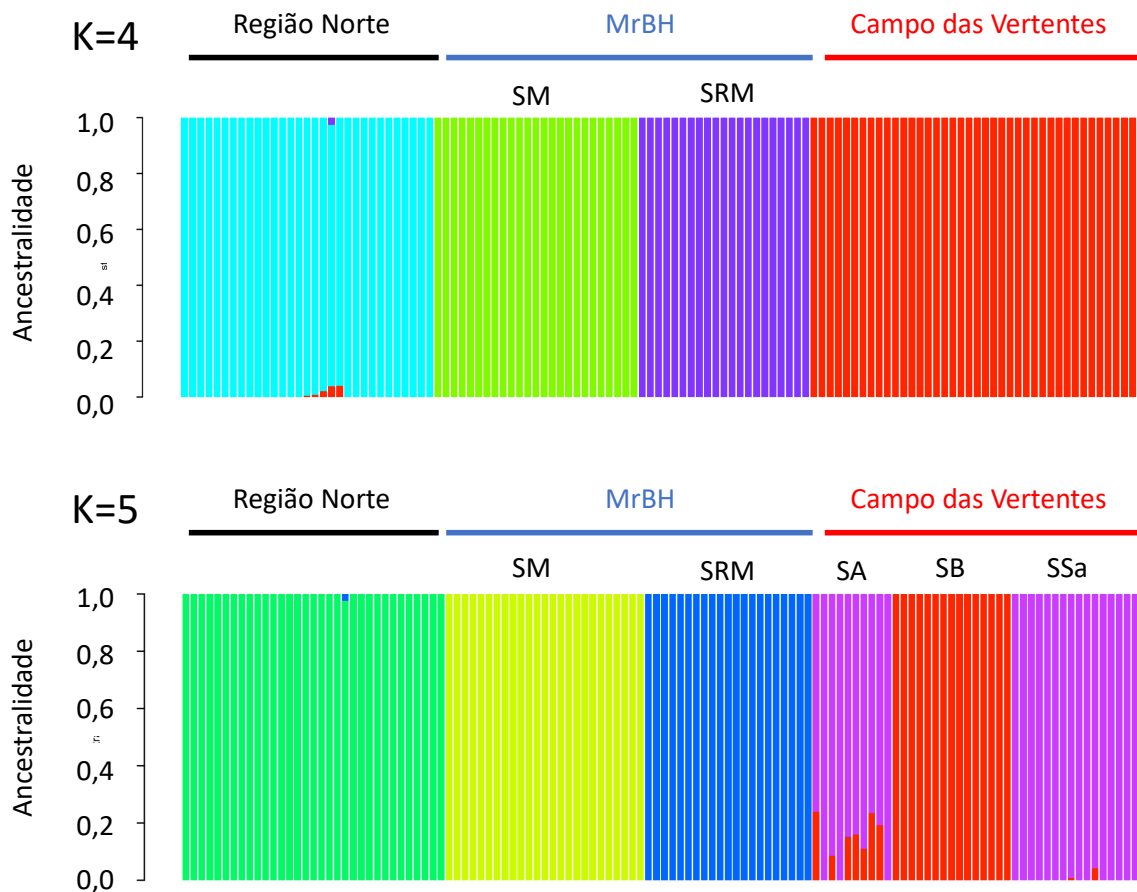


Figura 10. Estrutura populacional de *L. pinaster* segundo a estimativa dos valores de K por validação cruzada. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.

6. Marcadores SNP sob seleção positiva

6.1. Modelo BayeScan

A análise realizada pelo modelo BayeScan mostrou que 10497 loci com marcadores SNP são neutros, 17225 loci com marcadores SNP estão sob seleção balanceadora e 2009 loci com marcadores SNP estão sob seleção positiva (Figura 11).

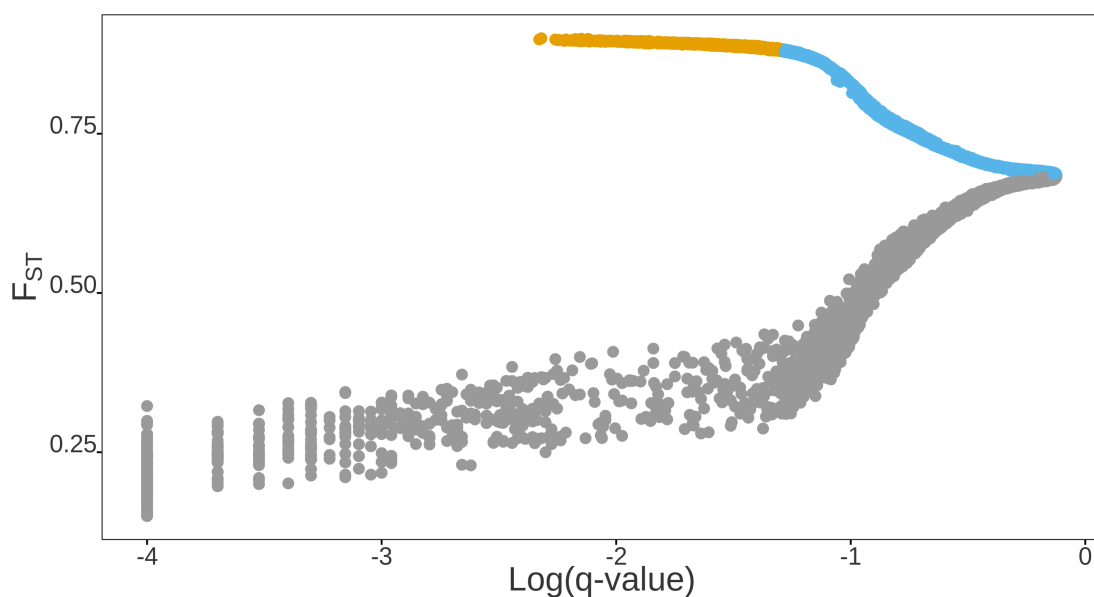


Figura 11. Distribuição dos loci com marcadores SNP segundo o modelo BayeScan expressos de acordo com os índices de fixação (F_{ST}). Os pontos cinzas indicam loci sob seleção neutra; os pontos azuis indicam os loci sob seleção balanceadora; e os pontos amarelos indicam loci sob seleção positiva.

Com a seleção de marcadores SNP realizada pelo modelo BayeScan, foi possível trabalhar com outras análises estatísticas a fim de verificar padrões genéticos das populações de *L. pinaster*. Utilizando o set neutro de SNP, realizamos uma nova análise de estrutura populacional, utilizando o software ADMIXTURE v1.2 e foi identificado que $K=5$ descreveu a melhor clusterização para as populações de *L. pinaster* (Figura 12). Essa análise indica que as regiões Norte e Campo das Vertentes apresentam pools genéticos únicos, enquanto a Região metropolitana de Belo Horizonte apresenta pools genéticos distintos entre as populações SM e SRM (Figura 13). A análise de estruturação genética do set neutro de SNP (Figura 13) corroborou com a estrutura genética de *L. pinaster* apresentada pelo set total de SNP (Figura 10), indicando que a variação de altitude e a estrutura geográfica das serras de Minas Gerais poderiam contribuir com a segregação alélica espacial entre as populações de *L. pinaster*.

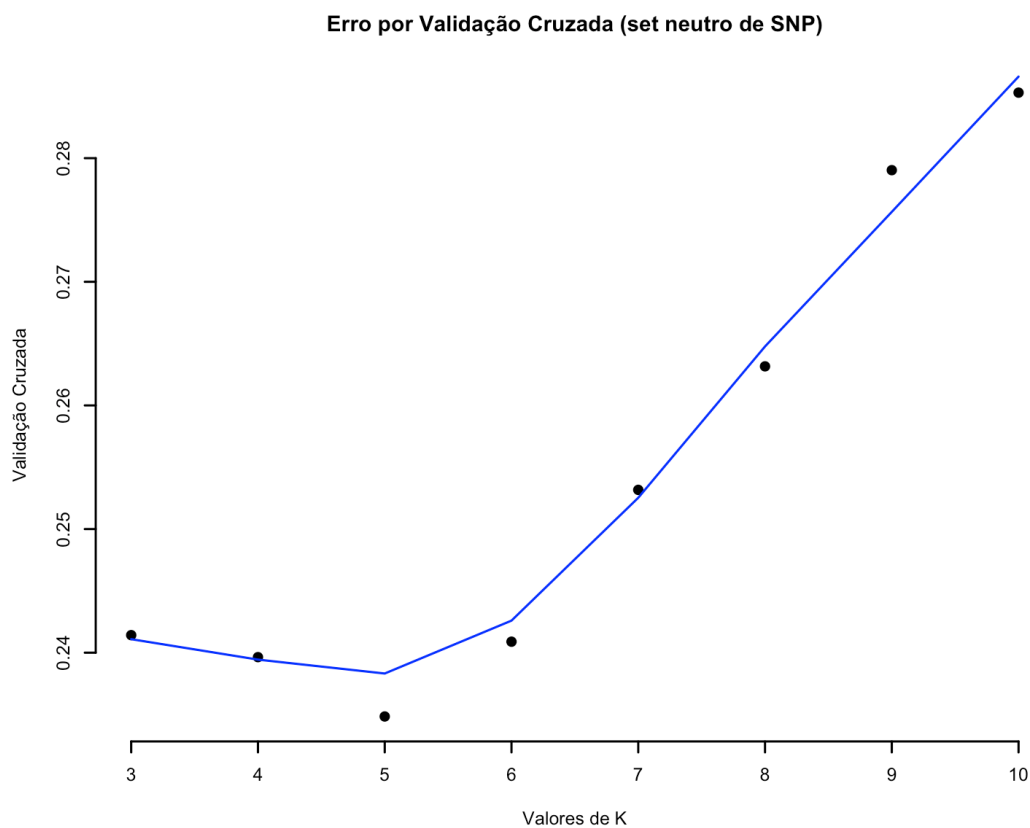


Figura 12. Análise de erro por validação cruzada (*cross-validation*) que descreve o melhor valor de K para a clusterização das populações de *L. pinaster* estudadas para o set neutro de SNPs.

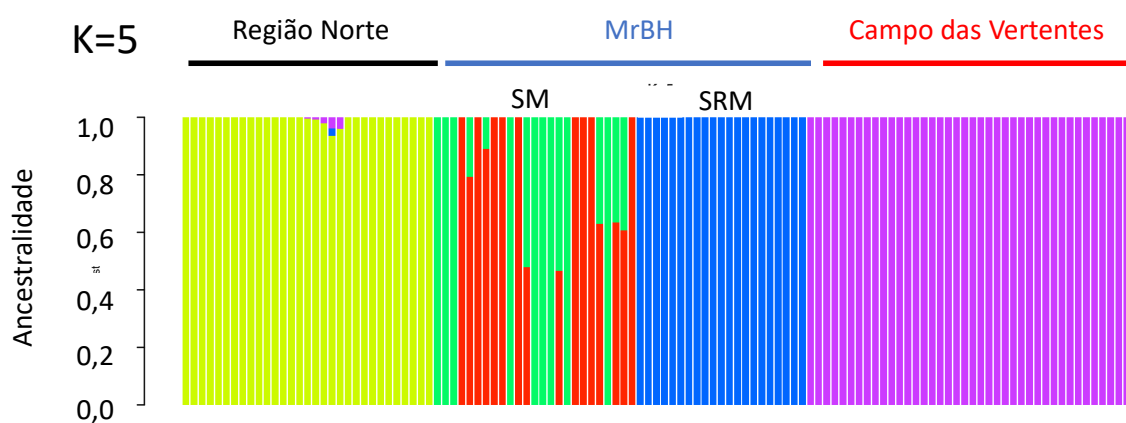


Figura 13. Análise da estrutura populacional de *L. pinaster* de acordo com o set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol;

ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.

A análise de componentes principais (ACP) se trata de análise multivariada não-exploratória, cuja finalidade da análise consiste na diminuição das dimensões dos dados, sendo ela empregada na obtenção de padrões matemáticos entre as variáveis analisadas (TOCK et al., 2020). Devido as suas características estatísticas, a ACP foi empregada na obtenção de padrões na estruturação das populações de *L. pinaster* de acordo com o set neutro de SNP. Com base no set neutro de marcadores SNP, foi possível verificar forte ação da estrutura geográfica das serras de Minas Gerais na segregação alélica nas populações (Figura 14).

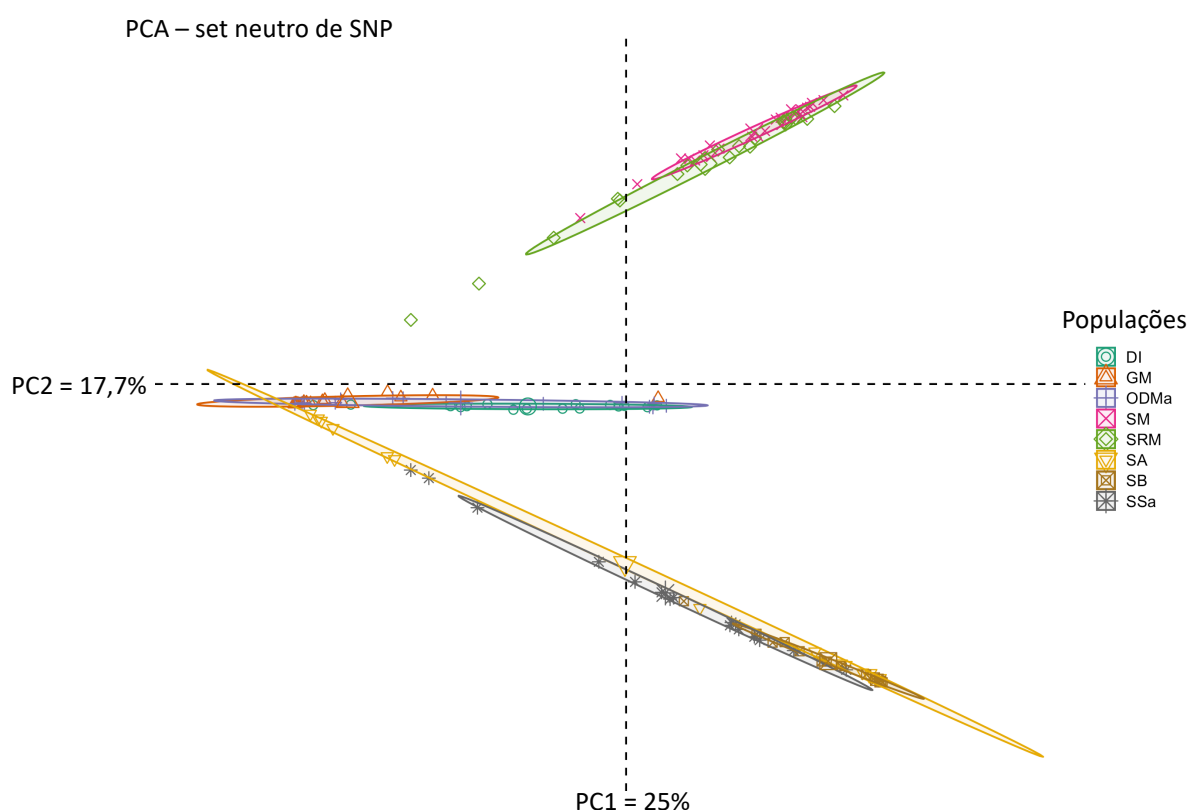


Figura 14. Análise de componentes principais (ACP) baseada no set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.

O set positivo de SNP selecionado pelo modelo BayeScan para análises de estrutura populacional também foi empregado na construção de análise de estrutura populacional. A análise de estrutura populacional empregando o set positivo de SNP (Figura 15) apresentou o mesmo padrão genético do set neutro de SNP (Figura 13) e do set total de SNP (Figura 10), confirmando que as populações da região Norte dos Campo das Vertentes apresentam pool genético semelhante. Além disso, as análises indicam que populações encontradas em elevadas altitudes (1498 m e 1366 m) na Região metropolitana de Belo Horizonte têm forte estruturação genética.

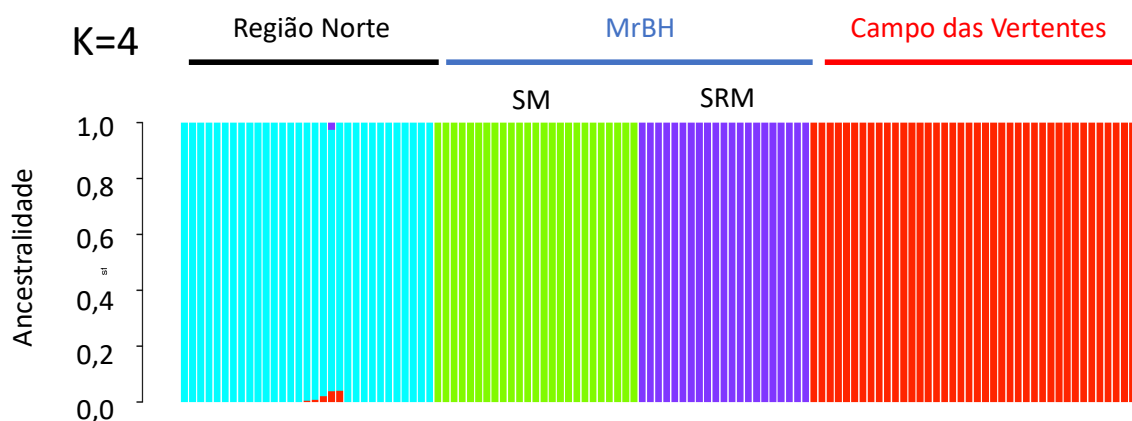


Figura 15. Análise da estrutura populacional de *L. pinaster* de acordo com o set positivo de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.

Com base no set positivo de marcadores SNP, foi realizada uma análise de componentes principais (ACP), indicando evidências da geografia das serras de Minas Gerais sobre o pool genético de *L. pinaster* (Figura 16), corroborando com os resultados obtidos pelo set neutro de SNP (Figura 14). Os resultados das ACP dos sets neutro e positivo indicam que as serras de Minas Gerais segregam espacialmente os alelos das populações de *L. pinaster* e que

a variação de altitude das serras pode contribuir com o aumento da diversidade genética da espécie.

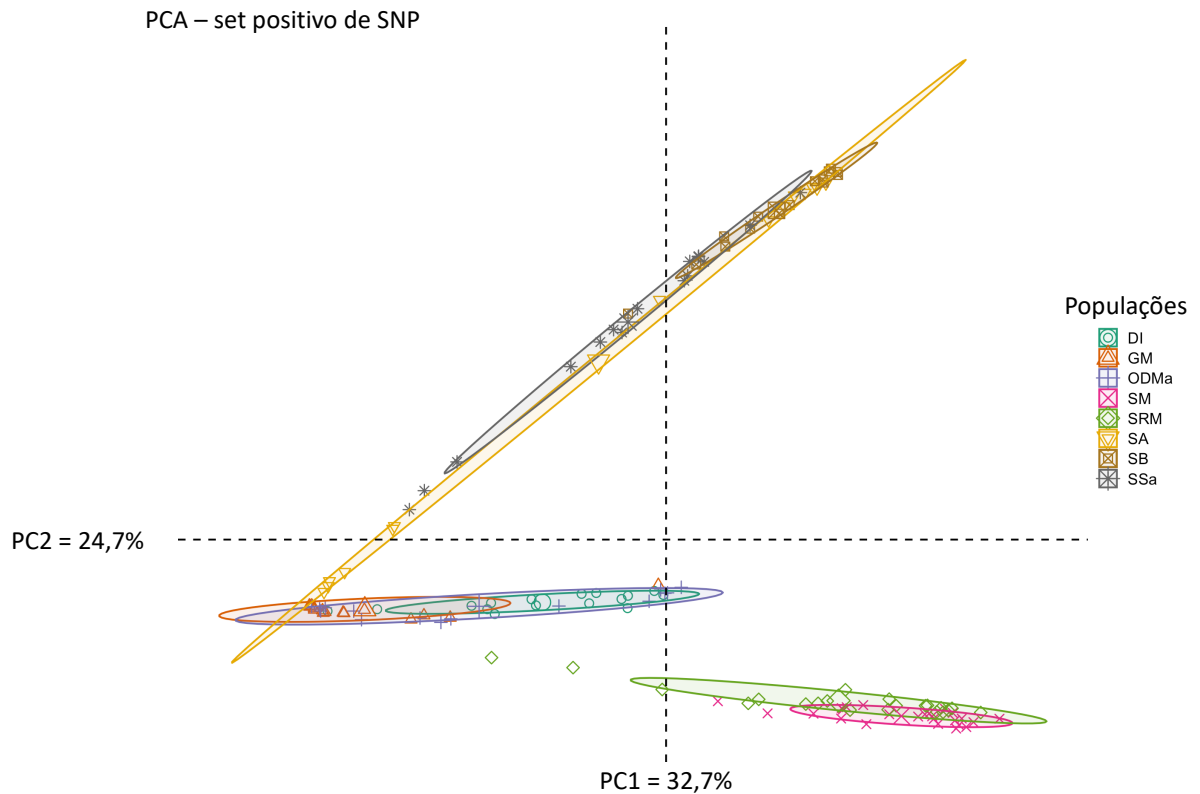


Figura 16. Análise de componentes principais (ACP) baseada no set neutro de marcadores SNP selecionados pelo método BayeScan. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto.

6.2. Modelo PCAdapt

O segundo modelo escolhido para avaliação de marcadores SNP sob seleção positiva foi o modelo PCAdapt. Esse modelo mostrou que 24556 loci com marcadores SNP são neutros e 5114 estão sob seleção positiva (Figura 17). Esse modelo foi ajustado com valores de $K=3$ de acordo com os valores das componentes principais, uma vez que o valor de $K=3$ se mostrou ótimo para a detecção de marcadores sob seleção positiva. Os resultados do modelo

PCAdapt corroboraram com os resultados obtidos pelo primeiro modelo BayeScan, mostrando forte ação das serras de Minas Gerais na composição genética de *L. pinaster*.

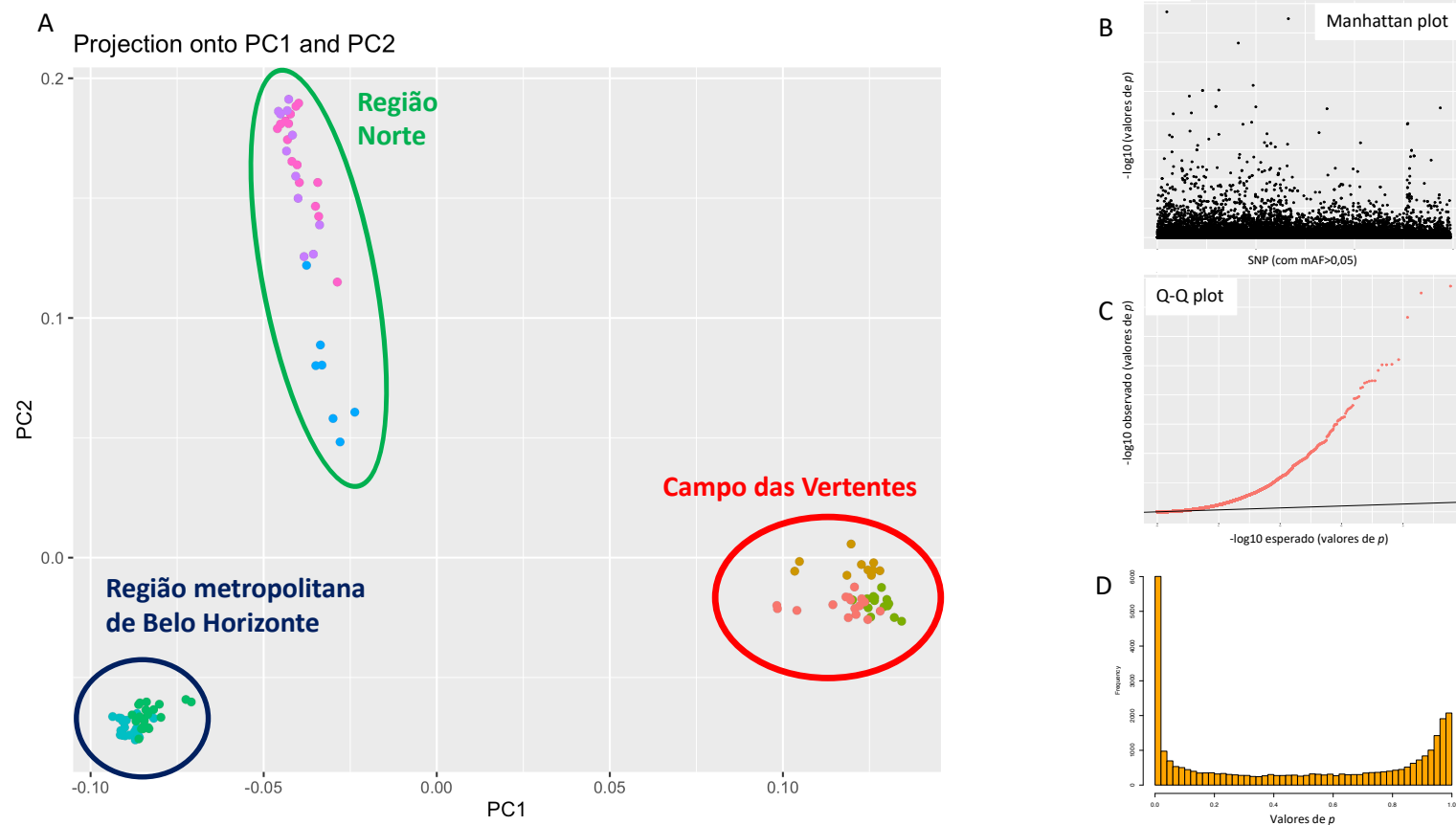


Figura 17. Análise de componentes principais (A) baseada na seleção de marcadores SNP segundo o modelo PCAdapt. DI: Diamantina; GM: Grão-Mogol; ODMa: Olhos D'Água; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola-Moça; SB: Serra Branca; SA: Serra da Arnica; e SSa: Serra do Salto. B: plot Manhattan; C: plot dos valores de Q-Q; D: plot dos valores de p ($p < 0,5 \times 10^{-3}$).

6.3. Testes de Mantel

A fim de provar se as serras de Minas Gerais podem alterar a diversidade e estrutura genética de *L. pinaster*, testes de Mantel entre F_{ST} e distâncias geográficas (Tabela 6) foram realizadas.

Tabela 6. Matriz de distâncias geográficas (km) entre as populações de *Lychnophora pinaster* Minas Gerais, Brasil.

	GM	ODMa	DI	SRM	SM	SSa	SA	SB
Grão-Mogol (GM)	0	111	115	394	414	561	571	559
Olhos D'Água (ODMa)	111	0	8	291	313	456	464	454
Diamantina (DI)	115	8	0	285	306	450	458	448
Serra do Rola-Moça (SRM)	394	291	285	0	23	167	181	165
Serra da Moeda (SM)	414	313	306	23	0	149	166	147
Serra do Salto (SSa)	561	456	450	167	149	0	31	5
Serra da Arica (AS)	571	464	458	181	166	31	0	37
Serra Branca (SB)	559	454	448	165	147	5	37	0

O teste de Mantel entre as matrizes genética (F_{ST}) e distâncias geográficas das populações expressou alto valor de correlação ($R=0,8036307$, $p=0,0036$). As populações de cada região amostrada estão próximas entre si, mas as regiões de coleta são espacialmente afastadas (Figura 1). As análises de componentes principais expressas com o set neutro e positivo de SNPs selecionados pelo modelo BayeScan (Figuras 14 e 16) e pelo modelo PCAdapt (Figura 17) também mostram que as populações de *L. pinaster* apresentam isolamento-por-distância, contribuindo significativamente com a diversidade genética e com a estrutura genética da espécie.

A fim de comprovar os efeitos da altitude na diversidade e estrutura genética de *L. pinaster*, foram realizados dois testes de Mantel entre as matrizes genéticas (F_{ST}) e as altitudes de cada população amostrada. O primeiro teste de Mantel envolveu todas as populações

amostradas e expressou correlação positiva entre a diversidade genética e altitude ($R=0,3861517$; $p=0,04709529$). O segundo teste de Mantel apresentou apenas os valores de altitude e F_{ST} das populações da região Norte (700-900 m) e MrBH (>1350 m), e expressou forte correlação positiva entre a diversidade genética e a altitude ($R=0,9423121$; $p=0,02739726$). Em conjunto com os dados genéticos anteriores, os resultados mostraram que populações encontradas em elevadas altitudes (superiores a 1350 m) são geneticamente diversas das demais populações encontradas em altitudes inferiores a 1300 m.

V - Discussão

1. Elevadas altitudes interferem nas diversidades genética e química de *L. pinaster*

Os dados suportam evidências de que as populações de *L. pinaster* localizadas em elevadas altitudes apresentam maiores diversidades química e genética. As populações de Serra da Moeda (SM) e Serra do Rola-Moça (SRM) estão localizadas em elevadas altitudes (>1350 m), cujas composições química e genética descritas em nossos resultados são divergentes das demais, indicando que serras com elevadas altitudes impactam na a diversidade genética e química de *L. pinaster*. A altitude é um dos fatores geográficos que causam maiores impactos na diversidade de populações nativas, culminando com o aparecimento de diferentes padrões genéticos nas populações (GUO et al., 2016; GÜNTHER et al., 2016; MEENA et al., 2016).

As Serras que compõem o Quadrilátero Ferrífero podem funcionar como barreira geográfica para as populações SM e SRM, fornecendo fatores climáticos únicos e ideais na promoção de adaptações locais. Como consequência desse processo, observamos grande diversidade genética e química nessas populações, como apontado em nossos resultados. Altitudes elevadas apresentam diversos fatores estressantes, como por exemplo as temperaturas extremas, forte radiação UV-B, grande incidência solar, baixos níveis de oxigênio e qualidade do solo (ZIDORN, 2010; ZHANG et al., 2016). Populações encontradas em elevadas altitudes apresentam alta diversidade genética (LIAN et al., 2018) aumentando a habilidade em se adaptar aos fatores bióticos e abióticos de cada região (ZHAO et al., 2016) e contribuindo com o aparecimento de adaptações locais (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2012). Os resultados indicam que a alta diversidade genética de *L. pinaster* na Região metropolitana de Belo Horizonte é ocasionada pelas elevadas altitudes, selecionando *pools* genéticos distintos nas populações dessa região.

As serras de Minas Gerais são complexas, contendo um conjunto de rochas de origem pré-Cambriana em sua formação básica que sofreram intemperismo até a era Fanerozóica, originando grandes serras com altitudes distintas (ALKMIM, 2018). A Região metropolitana de Belo Horizonte abriga o Quadrilátero Ferrífero, apresentando altimetria elevada devido a

presença de itabiritos e quartzitos, rochas com maiores resistências a erosão (SILVA, 2006). Além disso, é sabido que esses sistemas de rochas apresentam soerguimentos em momentos geológicos distintos (ALKMIN, 2018). Essa intensa erosão modificou a distribuição das fisionomias nas regiões, abrigando diferentes formações vegetacionais do Cerrado e da Mata Alântica, contribuindo com o estabelecimento de campos rupestres e florestas estacionais semidecíduais, ambas marcadas por eventos ambientais drásticos, como também pelas variações de altitude (SILVA, 2006; ALKMIM, 2018).

A Região metropolitana de Belo Horizonte apresenta variação de altitude entre 1200 metros e 2000 metros de altitude (ALKMIM, 2018; BARROS & MAGALHÃES JUNIOR, 2018), de forma que o gradiente de altitude afeta a composição química e a diversidade genética (MOUSTAFA et al., 2016). Como consequência do processo de isolamento causando pelas elevadas altitudes, há grande diversidade genética e nas composições químicas dos óleos essenciais nas populações dessa região, sugerindo que *L. pinaster* passa por processos de interação genótipo-ambiente, quando essas populações estão localizadas em elevadas altitudes.

2. Altitude, fatores climáticos e a geografia das serras de Minas Gerais alteram a diversidade genética e química de L. pinaster

Os dados suportam que há isolamento-por-distância entre as populações de regiões distintas e os fatores climáticos modificam as diversidades genética e química de *L. pinaster*. O isolamento geográfico se dá pela variação de altitude e variação dos fatores climáticos nas serras de Minas Gerais, os quais em conjunto contribuem com a evolução do Cerrado brasileiro (ALKMIM, 2018) e estabelecem fatores de seleção para espécies endêmicas, como é o caso de *Lychnophora pinaster* (SEMIR, 2011). A diversidade nucleotídica, H_o e F_{IS} descrevem o comportamento populacional indicando a qualidade do isolamento entre as populações estudadas (MONTALVO & ELLSTRAND, 2001; CORDEIRO et al., 2019). Os resultados corroboram com a literatura e indicam que há ação da estrutura geográfica e da variação de

altitude das serras no isolamento-por-distância entre as populações de *L. pinaster* encontradas em regiões diferentes, inferindo evidências de segregação diferencial de alelos entre as populações de *L. pinaster*, elevando a diversidade interpopulacional da espécie.

A estrutura genética corrobora com os resultados da diversidade genética, indicando que há efeitos seletivos diferenciais das serras Minas Gerais na manutenção das características genéticas de *L. pinaster*. *Medicago citrina* (Font Quer) Greuter é uma espécie endêmica do oeste do Mediterrâneo, apresentando estruturação e fragmentação populacional expressa pelos valores globais de *F_{ST}* em 0.386 e elevados valores de endogamia (JUAN et al., 2004). Apesar de *M. citrina* ser encontrada em ilhas diferentes, facilitando o isolamento populacional, um padrão semelhante é encontrado nos resultados, sugerindo que as serras de Minas Gerais funcionam como barreira geográfica, expressando pools genéticos distintos nas populações de *L. pinaster* encontradas em regiões distintas.

O isolamento-por-distância determinado pela estrutura geográfica e pela variação de altitude das serras e pelos fatores climáticos influencia a composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster*. A seleção natural ocorre à nível molecular, cujas interações abióticas ditam a evolução da biossíntese de isoprenóides nos vegetais (LORETO & SCHNITZLER, 2010) através de mutações de novo e duplicações gênicas as quais levam a neofuncionalização de enzimas do metabolismo especializado de substâncias voláteis, fenômeno de comum ocorrência nas terpeno-sintases (CHEN et al., 2011). Apontamos que a composição química diferencial dos óleos essenciais de *L. pinaster* é estabelecido pelo isolamento geográfico presente em Minas Gerais, mas também pela interação planta-ambiente.

A diversidade estrutural dos sesquiterpenos identificados nos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* também expressa a diversidade química dos óleos essenciais e mostram evidências de adaptação local. *Lychnophora pinaster* apresenta grande diversidade química na produção de sesquiterpenos com elevados teores de esqueletos cariofilanos, humulanos, nerolidanos e copaenos como observado nos estudos prévios com a espécie por SILVA (2016) e

MARQUES et al. (2020). De acordo com os resultados, os óleos essenciais da região Norte e Região metropolitana de Belo Horizonte apresentam alta diversidade estrutural dos sesquiterpenos com esqueletos dos tipos cariofilano, humulano, eudesmano, nerolidano, cedrano, germacrano dentre os constituintes mais abundantes (Tabela 2).

Os resultados da composição química dos óleos essenciais não são coincidentes com os obtidos nas análises genéticas a respeito da estruturação populacional na região Norte. De acordo com as análises genéticas (Figuras 13 e 15), a região Norte é constituída por um único *pool* gênico, mas a análise de Cluster e *heatmap* (Figuras 7 e 8) demonstram que as composições químicas dos óleos essenciais das populações da região Norte são quimicamente distintas entre si, sendo influenciada pela ação dos fatores ambientais. A análise de *heatmap* mostra que a população Grão Mogol (GM) apresenta forte correlação com as substâncias terpinen-4-ol, n-decanal, 14-hidróxi-9-epi-(*E*)-cariofileno, 14-hidróxi- α -humuleno, α -copaen-11-ol, espatulanol, *trans*-pinocarveol, mirtenal, *trans*-cariofileno e α -pineno. A população Ólhos D'Água (ODMa) apresenta forte correlação com as substâncias *cis*-cariofileno, óxido de cariofileno, cedr-8(15)-en-9- α -ol, 14-hidróxi-(*Z*)-cariofileno, *Z*-nerolidol, *allo*-epóxido de aromadendreno e γ -curcumen-15-al. A população DI (Diamantina) apresenta forte correlação com as substâncias linalol, *epi*-longipinanol, 14-hidróxi-4,5-dihidro-cariofileno, α -humuleno e germacrano. A presença de composições químicas distintas nessa região também foi observada por Marques et al (2020), mostrando grande diversidade química dos óleos essenciais nessa região.

As substâncias β -farneseno presente na população de Raposos (RPS); 14-acetoxi- α -humuleno e viridiflorol (população Serra do Rola-Moça: SRM); e 4-oxo-15-nor-eudesman-11-eno e isodauceno (população Serra da Moeda: SM) são responsáveis por gerar divergências entre as populações localizadas na Região metropolitana de Belo Horizonte. Uma razão para a presença da alta diversidade química de sesquiterpenos é baseada em suas funções ecológicas como repelentes de herbívoros e atração de polinizadores, cuja diversidade de animais

vinculadas a essas funções ecológicas poderiam ser diferentes entre as localidades, funcionando como pressões seletivas distintas para a biossíntese dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster*.

A população de Grão Mogol apresenta a maior produção de monoterpenos (18,52 % para hidrocarbonetos monoterpênicos e 10,1 % para monoterpenos oxigenados, Tabela 2), em especial com esqueleto pinano. Sabe-se que os pinenos são drasticamente influenciados por altas temperaturas e estresse hídrico (COPOLOVICI et al., 2012; ARENA et al., 2016), sendo utilizados pelas plantas como atrativos para polinizadores (REN et al., 2018) e desenvolvem um importante papel nas interações planta-inseto (MOFIKOYA et al., 2020). Como resultado de ambientes estressantes proporcionado por altas temperaturas, baixa disponibilidade de água e baixa umidade relativa do ar promovem ajustes metabólicos (SOUZA & LÜTTGE, 2015) que contribuem com a comunicação e a sobrevivência da planta ao ambiente. As alterações nas composições químicas dos óleos essenciais de *L. pinaster* mostram que ambiente e da variação de altitude auxiliam no estabelecimento de padrões químicos distintos.

VI – Conclusão

O estudo mostra que as populações naturais de *L. pinaster* encontradas em diferentes altitudes (700 m à 1498 m) nas serras de Minas Gerais apresentam alta diversidade química e genética inter e intrapopulacional. Os óleos essenciais de 96 indivíduos de seis populações apresentam altos níveis de sesquiterpenos oxigenados. Independentemente da região de ocorrência, a composição química dos óleos essenciais das populações amostradas na região Norte e Região Metropolitana de Belo Horizonte são distintas entre si. Os resultados das análises genéticas mostraram que as regiões de coleta possuem segregação espacial alélica determinada pela variação de altitude das serras e pela distância geográfica entre as regiões. Além disso, a altitude e os fatores climáticos alteram a composição química dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster*, sugerindo evidências de interação genótipo-ambiente.

VII - Considerações Finais

Com base em nossos resultados, apontamos que há grande divergência química e genética entre as populações de *L. pinaster* estudadas;

- As populações da Região metropolitana de Belo Horizonte apresentam *pools* genéticos distintos entre si, indicando que a altitude eleva a diversidade genética da espécie;
- Os óleos essenciais das folhas de *L. pinaster* representam um excelente exemplo de diversidade química sob efeito dos fatores climáticos, de forma que há seleção diferencial na produção de monoterpenos e sesquiterpenos entre as populações investigadas;
- Há evidências de seleção química na produção de sesquiterpenos oxigenados entre as populações SRM, SM, RPS, DI, ODMa e GM, mostrando que a variação de altitude, o isolamento geográfico e os fatores climáticos elevam a diversidade química dos óleos essenciais, contribuindo com estudos futuros para programas de conservação de *L. pinaster*.

VIII - Referencial Bibliográfico

- ADAMS, R.P., 2017. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Biochem. Syst. Ecol. 24, 594.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G.; AITKEN, S.N. **Conservation and the genetics of populations**. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK, 2013.
- ALEXANDER, D.H.; NOVEMBRE, J.; LANGE, K., Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v.19(9), 2009
- ALKMIM, F.F., História Geológica de Minas Gerais, in: Pedrosa-Soares, A.C.; Voll, E.; Cunha, E.C.; **Recursos Minerais de Minas Gerais on-line**. (Eds.). História geológica de Minas Gerais, primeira ed., Belo Horizonte: Companhia de Desenvolvimento de Minas Gerais (CODEMGE), 2018, pp. 1-35.
- ANDERSON, JV (editor). **Advances in Plant Dormancy**. Springer International Publishing, Switzerland, 2015, pp. 311.
- De ANDRADE WAGNER, M., LOEUILLE, B.F.P., SINISCALCHI, C.M., MELO-DE-PINNA, G.F., PIRANI, J.R. Diversity of non-glandular trichomes in subtribe *Lychnophorinae* (Asteraceae: Vernonieae) and taxonomic implications. **Plant Systematic and Evology**, v. 300, p. 1219–1233, 2014.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical Composition, Plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3530–3535, 2004.
- ARENA, C.; TSONEV, T.; DONEVA, D.; DE MICCO, V.; MICHELOZZI, M.; BRUNETTI, C.; CENTRITTO, M.; FINESCHI, S.; VELIKOVA, V.; LORETO, F. The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 22-132, 2016.

- BAKHA, M., EL MTILI, N., MACHON, N., ABOUKHALID, K., AMCHRA, F.Z., KHIRAOUI, A., GIBERNAU, M., TOMI, F., AL FAIZ, C., Intraspecific chemical variability of the essential oils of Moroccan endemic *Origanum elongatum* L. (Lamiaceae) from its whole natural habitats. **Arabian Journal of Chemistry**, v.13, p. 3070–3081, 2020.
- BARROS, L. F. P.; MAGALHÃES JUNIOR, A.P. Reconstituição de eventos geomorfológicos no Quadrilátero Ferrífero/MG a partir de registros deposicionais fluviais: a bacia do rio Paraopeba. **Quaternary and Environmental Geosciences**, v. 9, p. 36–48, 2018.
- BARUQUI, A.M.; NAIME, U.J.; MOTTA, P.E.F.; FILHO, A.C. 2006. **Levantamento de reconhecimento de média intensidade dos solos da zona Campos das Vertentes**. Dados eletrônicos – Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Solos, ISSN 1678-0892; 96). Disponível em http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPS-2010/14927/1/bpd96-2006-levant_campos-vertentes.pdf.
- BITENCOURT, C.; RAPINI, A.; DAMASCENA, L.S.; JUNIOR, P.M. The worrying future of the endemic flora of a tropical mountain range under climate change. **Flora**, v. 2018, p. - 10, 2016.
- CATCHEN, J., HOHENLOHE, P.A., BASSHAM, S., AMORES, A., CRESKO, W.A. Stacks: An analysis tool set for population genomics. **Molecular Ecology**, v. 22, 3124–3140, 2013.
- CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **The Plant Journal**, v. 66, p. 212–229, 2011.
- CIRAK, C.; RADUSIENE, J.; JAKTAS, V.; IVANAUSKAS, L.; SEYIS, F.; YAYLA, F. Altitudinal changes in secondary metabolite contents of *Hypericum androsaemum* and *Hypericum polyphyllum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 70, p. 108-115, 2017.

CHAUHAN, R.S.; NAUTIYAL, M.C.; CECOTTI, R.; MELLA, M.; TAVA, A. Variation in the essential oil composition of *Angelica archangelica* from three different altitudes in Western Himalaya, India. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 401-404, 2016.

COPLOVICI, L.; KÄNNASTE, A.; PAZOUKI, L.; NIINEMETS INSTITUTE, Ü. Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 664– 672, 2012.

CORDEIRO, E.M.G., MACRINI, C.M., SUJII, P.S., SCHWARCZ, K.D., PINHEIRO, J.B., RODRIGUES, R.R., BRANCALION, P.H.S., ZUCCHI, M.I. Diversity, genetic structure, and population genomics of the tropical tree *Centrolobium tomentosum* in remnant and restored Atlantic forests. **Conservation Genetics**, v. 20, p. 1073–1085, 2019.

CURADO, MA; OLIVEIRA, CBA; JESUS, JG; SANTOS, SC; SERAPHIN, JC, FERRI, PH. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lych-nophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2363-2369, 2006.

DE, A.; MUKHERJEE, S.; DEY, M. Altitudinal variation of anti-human-pathogenic- bacterial activity and antioxidative properties of darjeeling himalayan *Marchantia polymorpha* L. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 5, p. 33-42, 2015.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DRAY, S.; DUFOUR, A.B., The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. **Journal of Statistical Software**, v. 22, p. 1–20. 2007.

DUQUE, AS; ALMEIDA, AM; SILVA, AB; SILVA, JM; FARINHA, AP; SANTOS, D; FEVEREIRO, P; ARAÚJO, SS. **Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive, em abiotic stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**, Vahdati, K; Leslie, C (Editores). Editora InTech, ISBN 978-953-51-1024-8, 2013, pp. 418.

ECHTERNACHT, L.; TROVÓ, M.; OLIVEIRA, C.T.; PIRANI, J.R. Areas of endemismo in the Espinhaço range in Minas Gerais, Brazil. **Flora**, v. 206, p. 782-791, 2011.

ELSHIRE, R.J.; GLAUBITZ, J.C.; SUN, Q.; POLAND, J.A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E.S.; MITCHELL, S.E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **Plos One**, v. 6(5), e19379.

EMERSON, KJ; CONN, JE; BERGO, ES; RANDEL, MA; SALLUM, MAM. Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: *Culicidae*) clusters by major biogeographical region. **Plos One**, v. 10(7): e0130773. DOI:10.1371/journal.pone.0130773, 2015.

FILATOV, D.A.; OSBORNE, O.G.; PAPADOPULOS, A.S.T. Demographic history of speciation in a *Senecio* altitudinal hybrid zone on Mt. Etna. **Molecular Ecology**, 25:2467–2481, 2016.

FISCHER, M.C., FOLL, M., EXCOFFIER, L., HECKEL, G. Enhanced AFLP genome scans detect local adaptation in high-altitude populations of a small rodent (*Microtus arvalis*). **Molecular Ecology**, v. 20, p. 1450–1462, 2011.

FOLL, M., GAGGIOTTI, O. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. **Genetics** v. 180, p. 977–993, 2008.

GANZERA, M.; GUGGENHEBERGER, M.; STUPPNER, H.Ç ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA. **Planta Medica**, v. 74, p. 453-457, 2008.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; SEGARRA-MORAGUES, J.G.; WIDMER, A.; ESCUDERO, A.; IRIONDO, J.M.; Unravelling genetics at the top: Mountain islands or isolated belts? **Annals of Botany**, v. 110, p. 1221–1232, 2012.

GU, Z., EILS, R., SCHLESNER, M., Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics** v. 32, p. 2847–2849, 2016.

- GÜNTHER, T., LAMPEI, C., BARILAR, I., SCHMID, K.J. Genomic and phenotypic differentiation of *Arabidopsis thaliana* along altitudinal gradients in the North Italian Alps. **Molecular Ecology**, v. 25, p. 3574–3592, 2016.
- GUO, B., LU, D., LIAO, W.B., MERILÄ, J. Genomewide scan for adaptive differentiation along altitudinal gradient in the Andrew's toad *Bufo andrewsi*. **Molecular Ecology**, 25, 3884–3900, 2016.
- HABER, L. L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microsatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.** 151 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008
- HARRIS, I., OSBORN, T.J., JONES, P., LISTER, D. Version 4 of the CRU TS monthly high-resolution gridded multivariate climate dataset. **Scientific Data**, v. 7, p. 1–18, 2020.
- HIJMANS, R.J. raster: Geographic Data Analysis and Modeling. R package version 3.4-5. <https://CRAN.R-project.org/package=raster>, 2020.
- IBGE, 1972. **Carta Geológica do Brasil ao Milionésimo**. Ministério do Planejamento e Coordenação Geral, Instituto Brasileiro de Geografia, Brasília.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Aromatic natural rawmaterials: Vocabulary. ISO 9235, Genebra, 2013, 8 p.
- JUAN, A., CRESPO, M.B., COWAN, R.S., LEXER, C., FAY, M.F. Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2679–2690, 2004.
- KASSAMBARA, A., MUNDT, F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7, 2020.

- KHADIVI-KHUB A, KARIMI E, HADIAN J. Population genetic structure and trait associations in forest savory using molecular, morphological and phytochemical markers. **Gene** v. 546(2), p. 297-308, 2014.
- KIM, C; GUO, H; KONG, W; CHANDNANI, R; SHUANG, L-S; PATERSON, AH. Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. **Plant Science**, v. 242, p. 14-22, 2016.
- KÖRNER, C. **Alpine plant life. Functional plant ecology of high mountain ecosystems.** Springer, Berlin, 1999.
- LÊ, S., JOSSE, J., HUSSON, F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. **Journal of Statistic Software**, v. 25, p. 1–18, 2008.
- LI, X.; ZHANG, S.; YANG, Z.; SONG, K.; YI, T. Conservation genetics and population diversity of *Erigeron breviscapus* (Asteraceae), an important Chinese herb. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, p. 156-166, 2013.
- LIAN, T., LI, D., TAN, X., CHE, T., XU, Z., FAN, X., WU, N., ZHANG, L., GAUR, U., SUN, B., YANG, M. Genetic diversity and natural selection in wild fruit flies revealed by whole-genome resequencing. **Genomics**, v. 110, p. 304–309, 2018.
- LOBO, R.; PRABHU, K. S.; SHIRWAIKAR, A. & SHIRWAIKAR, A. *C. zedoaria* (White turmeric): a review of its chemical pharmacological and ethnomedicinal properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 13-21, 2009.
- LOEUILLE, B., SEMIR, J., LOHMANN, L.G., PIRANI, J.R. A phylogenetic analysis of *Lychnophorinae* (asteraceae: Vernonieae) based on molecular and morphological data. **Systematic Botany**, v. 40, p. 299–315, 2015.
- LOEUILLE, B., SEMIR, J., PIRANI, J.R., 2019. A synopsis of *Lychnophorinae* (Asteraceae: Vernonieae), **Phytotaxa**. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.398.1.1>
- LORETO, F., SCHNITZLER, J.-P. Abiotic stresses and induced BVOCs. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 154–166, 2010.

- LUU, K., BAZIN, E., BLUM, M.G.B., pcadapt: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, p. 67–77, 2017.
- MARQUES, A.P.S., BONFIM, F.P.G., SANTOS, D.G.P.O., LIMA, M. DA P., SEMIR, J., MARTINS, E.R., ZUCCHI, M.I., HANTAO, L.W., SAWAYA, A.C.H.F., MARQUES, M.O.M. Chemical diversity of essential oils from the Brazilian medicinal plant *Lychnophora pinaster* Mart from different environments. **Industrial Crops and Products**, v. 156, 112856, 2020.
- MEENA, B.; TIWARI, V.; SINGH, N.; MAHAR, K. S.; SHARMA, Y. K.; RAN, T. S. Estimation of genetic variability and population structure in *Ephedra gerardiana* Wall. ex Stapf (Ephedraceae): An endangered and endemic high altitude medicinal plant. **Agri Gene**, v 1, p. 116–125, 2016.
- MELITO, S.; PETRETTO, G.I.; PODANI, J.; FODDAI, M.; MALDINI, M.; CHESSA, M.; PINTORE, G. Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. microphyllum essential oils composition. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 242-250, 2016.
- MEIRMANS, P. G. **Hardy–Weinberg Equilibrium**. Encyclopedia of Ecology, 118–126, 2019.
- MEYER, S.T.; FRANCESCHINELLI, E.V. Estudo florístico de plantas vasculares associadas às áreas úmidas na Cadeia do Espinhaço (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 677-691, 2010.
- MONTALVO, A.M., ELLSTRAND, N.C. Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 258–269, 2001.
- MOUSTAFA, M.F., HESHAM, A.E.L., QURAISHI, M.S., ALRUMMAN, S.A. Variations in genetic and chemical constituents of *Ziziphus spina-christi* L. populations grown at various altitudinal zonation up to 2227 m height. **J. Genet. Eng. Biotechnol.** v. 14, p. 349–362, 2016

MOFIKOYA, A. O.; YLI-PIRILÄ, P.; KIVIMÄENPÄÄ, M.; A, BLANDE, J. D.; VIRTANEN, A.; HOLOPAINEN, J. K. Deposition of α -pinene oxidation products on plant surfaces affects plant VOC emission and herbivore feeding and oviposition. **Environmental Pollution**, v. 263, p.114437, 2020.

MONTEIRO, L.; MACHADO, N.; MARTINS, E.; POUGY, N.; VERDI, M.; MARTINELLI, G.; LOYOLA R. Conservation priorities for the threatened flora of mountaintop grasslands in Brazil. **Flora**, 2017.

PARREIRA, B., QUÉMÉRÉ, E., VANPÉ, C. et al. Genetic consequences of social structure in the golden-crowned sifaka. **Heredity**, v. 125, p. 328–339, 2020.

POLAND, J.; BROWN, P.J.; SORRELLS, M.E.; JANNINK, J.C. 2012. Development of high-density genetic maps for Barley and Wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. **PLoS One**, v. 7(2): e32253.

PORTELLA, R. O. ; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; ALMEIDA, L. F. R. Diferentes níveis de luminosidade determinam o perfil fitoquímico de plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Trends in Bioscience & Biotechnology**, v. 1, p. 13-15, 2014.

PRITCHARD, R.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.

REIS, É.S., PINTO, J.E.B.R., BERTOLUCCI, S.K. V, CORRÊA, R.M., PAULA, J.R., ANDRADE, S.T., FERRI, P.H., Seasonal Variation in Essential Oils of *Lychnophora*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 2008–2011, 2010.

REN, J., SUN, DAOKUN, CHEN, L., YOU, F.M., WANG, J., PENG, Y., NEVO, E., SUN, DONGFA, LUO, M.-C., PENG, J. Genetic diversity revealed by single nucleotide polymorphism markers in a worldwide germplasm collection of durum wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 7061–7088, 2018.

ROSENMAI, P. Calculating a distance matrix for geographic points using R. 30 de janeiro de 2014. Disponível em: <https://eurekastatistics.com/calculating-a-distance-matrix-for-geographic-points-using-r/>. Acesso em: 25/11/2019.

RUSSELLO, M.A.; WATERHOUSE, M.D.; ETTER, P.D.; JOHNSON, E.A. From promise to practice: pairing non-invasive sampling with genomics in conservation. **Peer Journal**, v. 21, e1106, 201.

SÁNCHEZ, C. F. B. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética** (Dissertação). Universidade Federal de Viçosa- UFV, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Magister Scientiae, 2008.

SELSELEH M, HADIAN J, EBRAHIMI SN, SONBOLI A, GEORGIEV MI, MIRIJALILI MH. Metabolic diversity and genetic association between wild populations of *Verbascum songaricum* (Scrophulariaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 137(1), p. 112-125, 2019/

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. 1991. 515 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas. 1991.

SEMIR, J; REZENDE, AR; MONGE, M; LOPES, NP. **As arnicas endêmicas do Brasil: uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae)**. Editora UFOP, 2011, pp. 211.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V.; Oleos volateis. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO., J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianopolis: Editora da UFSC, 2007, 467-496.

SINGH, G.; SINGH, O. P. & MAURYA, S. Chemical and biocidal investigation on essential oils of same indian *Curcuma* species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, pp. 75-81, 2002.

- SILVA, RMS. **Diversidade Genética de duas espécies de *Chamaecrista* com diferentes amplitudes de distribuição ao longo da Cadeia do Espinhaço.** Dissertação de Mestrado, UFMG, 2006.
- SILVA, PSS. **Caracterização da composição química dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. em função da sazonalidade.** Dissertação de Mestrado, FCA/UNESP, 2013.
- SILVA, PSS. **Caracterização da diversidade genética e composição química de *Lychnophora pinaster* Mart.** Tese de Doutorado, FCA/UNESP, 2016.
- SORO, L.C.; MUNIER, S.; PELISSIER, Y.; GROSMARE, L.; YADA, R.; KITTS, D.; ATCHIBRI, ALO-A.; GUZMAN, C.; BOUBARD, F.; MENUT, C.; ROBINSON, J. C.; POUCHERET, P. Influence of geography, seasons and pedology on chemical composition and anti-inflammatory activities of essential oils from *Lippia multiflora* Mold leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194(24), p. 587-594, 2016.
- SOUZA, G. M.; LÜTTGE, U. **Stability as a Phenomenon Emergent from Plasticity–Complexity–Diversity in Eco-physiology**; in LÜTTGE, U.; BEYSCHLAG, W. (eds.), *Progress in Botany*, Progress in Botany 76, Springer International Publishing Switzerland, 2015, pp. 211-239.
- SPITALER, R.; WINKLER, A.; LINS, I.; YANAR, S.; STUPPNER, H.; ZIDORN, C. Altitudinal variation of phenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: a 3-year comparison. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 369-375, 2006
- VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463–471, 1963.
- WANG, X; WANG, D; SUN, Y; YANG, Q; CHANG, L; WANG, L; MENG, X; HUANG, Q; JIN, X; TONG, Z. Comprehensive proteomics analysis of laticifer latex reveals new insights into ethylene stimulation of natural rubber production. **Scientific Reports**, 5:13778, DOI: 10.1038/srep13778, 2015.

- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 395-420, 1965.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among populations. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.
- YAHIA IBH, JAOUADI R, TRIMECH R, BOUSSAID M, ZAOUALI Y. Variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Mentha x rotundifolia* (L.) Huds. (*Lamiaceae*) collected from different bioclimatic areas of Tunisia. **Biochemical and Systematic Ecology**, v. 84, p. 8-16, 2019.
- YUAN X-Y, SUN Y-W, BAI X-R, DANG M, FENG X-J, ZULFIQAR S, ZHAO P. Population Structure, Genetic Diversity, and Gene Introgression of Two Closely Related Walnuts (*Juglans regia* and *J. sigillata*) in Southwestern China Revealed by EST-SSR Markers. **Forests** v. 9(10) p. 646, 2018.
- ZHANG, JING, TIAN, Y., YAN, L., ZHANG, G., WANG, X., ZENG, Y., ZHANG, JIAJIN, MA, X., TAN, Y., LONG, N., WANG, Y., MA, Y., HE, Y., XUE, Y., HAO, S., YANG, S., WANG, W., ZHANG, L., DONG, Y., CHEN, W., SHENG, J., Genome of Plant Maca (*Lepidium meyenii*) Illuminates Genomic Basis for High-Altitude Adaptation in the Central Andes. **Molecular Plant**, v. 9, p. 1066–1077, 2016.
- ZHAO, L.L., ZHANG, Y., WANG, P.C., LUO, T.Q., ZHANG, W., CHEN, J. Morphological and genetic variations of *Sophora davidii* populations originating from different altitudes in the mountains of southwestern China. *Flora Morphol. Distrib.* **Functional Ecology of Plants**, v. 224, p. 1–6. 2016.
- ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolites in flowering heads of the Asteraceae: trends and causes. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 197-203, 2010.

ZHONG, J-J. **Plant Secondary Metabolites em Comprehensive Biotechnology**, Moo-Young, M (editor). Editora Elsevier B.V., ISBN: 978-0-08-088504-9, 2011, pp. 299-308.

ZUCCHI, M.I., CORDEIRO, E.M.G., WU, X., LAMANA, L.M., BROWN, P.J., MANJUNATHA, S., VIANA, J.P.G., OMOTO, C., PINHEIRO, J.B., CLOUGH, S.J. Population genomics of the neotropical brown stink bug, *euschistus heros*: The most important emerging insect pest to soybean in brazil. **Frontiers in Genetics** v. 10, p. 1–12, 2019.

IX – Anexos

O espectro de RMN ^1H mostrou dois grupos metílicos como singletos δ 0,96 e 0,95, um grupo metilênico de dupla ligação exocíclica como singletos largos em δ 4,99 e 4,95 além de hidrogênios metilênicos e metínicos na região entre região δ 2,47-1,03. No espectro de RMN ^{13}C o deslocamento da carbonila foi verificado em δ 214,81 e da dupla ligação em δ 152,91 e 111,10. O espectro DEPT confirmou a presença de dois grupos metílicos, sete grupos metilênicos, dois grupos metínicos e três carbonos desidrogenados, indicando um norsesquiterpeno. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C sugeriram sesquiterpeno com esqueleto eudesmano e ausência de uma metila (Tabela 7). Os sesquiterpenos do tipo noreudesmano são descritos em espécies da família Astereaceae (WU, et al, 2006).

Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H (300 MHz), ^{13}C e DEPT (75 MHz) em CDCl_3 do sesquiterpeno com índice de retenção de 1504 isolado das folhas de *Lychnophora pinaster*, população da Serra da Moeda, MG, Brasil

Posição	RMN ^1H	RMN ^{13}C	DEPT
1	156 m e 1,40 m	28,46	CH2
2	1,64 m e 1,03 m	21,99	CH2
3	2,43	43,96	CH2
4	---	214,81	C
5	1,52 dd (6,5 e 3,3 Hz)	51,11	CH
6	2,47 m e 2,37 m	33,21	CH2
7	2,32 m	44,35	CH
8	2,54	44,46	CH2
9	1,70 m e 1,53 m	39,60	CH2
10	--	33,84	C
11	--	152,91	C
12	4,99 s largo e 4,95 s largo	111,10	CH2
13	0,96 s	29,78	CH3
14	0,95 s	21,84	CH3

As correlações à J-1 foram observadas no experimento HSQC. No HMBC a correlação à J-3 entre o hidrogênio em δ 1,52 (H-5) com o carbono em δ 21,84 (C-14) confirmou a posição da metila 14. Os hidrogênios em δ 2,47 e 2,37 (H-6) mostraram correlações com os carbonos em δ 214,81 (J-3), 152,91 (J-3), 111,10 (J-4), 44,35 (J-2) e 33,84 (J-3). As demais correlações nesse experimento podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 8. Dados espectrais de RMN 2D (HSQC e HMBC) do sesquiterpeno com índice de retenção de 1504 isolado das folhas de *Lychnophora pinaster*, população da Serra da Moeda, MG, Brasil

Posição	H	HSQC	HMBC*
1	1,56 e 1,40	28,46	43,96 (J-3), 33,84 (J-2), 21,99 (J-2),
2	1,64 e 1,03	21,99	214,81 (J-2), 21,99 (J-2), 33,84 (J-3)
3	2,43	43,96	28,46 (J-3), 21,99 (J-2)
5	1,52	51,11	44,35 (J-3), 33,21 (J-2), 21,84 (J-3)
6	2,47 e 2,37	33,21	214,81 (J-3), 152,91 (J-3), 111,10 (J-4), 44,35 (J-2), 33,84 (J-3)
7	2,32 m	44,35	152,91 (J-2), 111,10 (J-3), 44,46 (J-3)
8	2,54	44,46	152,91 (J-3)
9	1,70 e 1,53	39,62	51,11(J-3), 44,35 (J-3), 33,84 (J-2), 28,46 (J-3), 21,84 (J-3)
12	4,99 e 4,95	111,10	152,91 (J-2), 43,35 (J-3), 33,21 (J-4)
13	0,96 s	29,78	Sobreposição
14	0,95 s	21,84	Sobreposição

Com os resultados apresentados, foi possível atribuir a fórmula molecular $C_{14}H_{22}O$ para a substância com índice de retenção linear de 1506, sendo identificada como 4-*oxo*-15-nor-eudesmano-11-eno (Figura 18). Essa substância também é encontrada em duas populações da região Norte (ODMa, DI) e três populações da Região metropolitana de Belo Horizonte (SRM, SM e RPS).

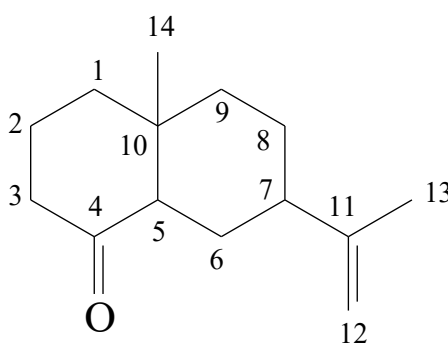


Figura 18. Estrutura química do sesquiterpeno 4-*oxo*-15-nor-eudesmano-11-eno isolado no óleo essencial da população Serra da Moeda com índice de retenção linear de 1504(IRL calc).